

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-518721
(P2015-518721A)

(43) 公表日 平成27年7月6日(2015.7.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	4 C O 8 6
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-513901 (P2015-513901)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月21日 (2013. 5. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年1月21日 (2015. 1. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2013/004463
 (87) 国際公開番号 W02013/176477
 (87) 国際公開日 平成25年11月28日 (2013. 11. 28)
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0053950
 (32) 優先日 平成24年5月22日 (2012. 5. 22)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

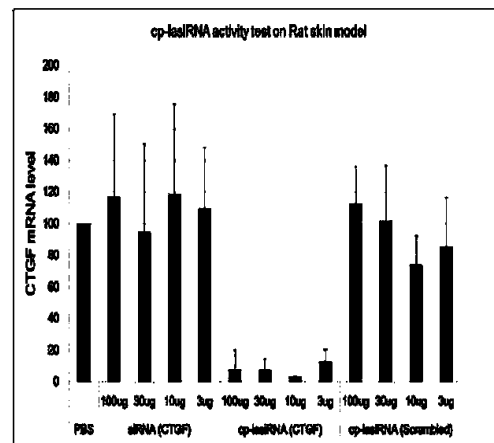
(71) 出願人 514298162
 オリックス ファーマシューティカルズ
 インコーポレイテッド
 O l i x P h a r m a c e u t i c a l
 s I n c .
 大韓民国, 1 5 3 - 7 7 7, ソウル, クム
 チョング, チギタルーロ 9-ギル, 9
 9, スター バリ, ルーム 1 3 0 5
 (74) 代理人 100090251
 弁理士 森田 憲一
 (74) 代理人 100139594
 弁理士 山口 健次郎
 (74) 代理人 100185915
 弁理士 長山 弘典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞内貫通能を持ってRNA干渉を誘導する核酸分子およびその用途

(57) 【要約】

本発明は、新規構造の細胞内貫通能を持つRNA i 誘導核酸分子およびその用途に関し、より詳細にはRNA i を誘導する二本鎖の核酸分子に含まれている少なくとも一つのヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートまたはホスホロジチオエートに置換されて、親油性化合物が結合された構造を持つようにして、優秀な目的遺伝子抑制効率を持ちながらも別途の細胞伝達体なしに細胞内貫通能を持つ新しい構造の核酸分子およびこれを利用した目的遺伝子の発現抑制方法に関する。本発明に係る核酸分子構造は、コレステロール改変およびホスホロチオエート改変を共に導入することによって、優秀な遺伝子抑制効率を維持しながらも別途の細胞伝達体がなくても細胞内貫通能を持つことができ、実際の標的部位にRNA i 誘導のための十分な量に伝達することができて、従来問題になったインビボ伝達問題を解消させることができる。そこで、本発明に係る核酸分子は、従来のsiRNA分子に代えてsiRNAを利用した癌やウイルス感染治療などに活用することができて有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸と相補的な領域を含む第 1 鎖と、前記第 1 鎖と相補的結合を形成する第 2 鎖で構成される RNA i 誘導用二本鎖核酸分子において、前記核酸分子に含まれている少なくとも一つのヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートまたは、ホスホロジチオエートで置換されていて、親油性化合物が結合されていることを特徴とする、細胞内貫通能を持つ RNA i 誘導用核酸分子。

【請求項 2】

前記 RNA i 誘導用二本鎖核酸分子は、標的核酸と相補的な一部領域を含む 24 ~ 121 nt 長さの第 1 鎖と、前記第 1 鎖の標的核酸と相補的な一部領域と相補的結合を形成する領域を持つ 13 ~ 21 nt 長さの第 2 鎖で構成されることを特徴とする請求項 1 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

10

【請求項 3】

前記第 1 鎖の 5' 方向の末端が平滑末端であることを特徴とする請求項 2 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

【請求項 4】

前記第 1 鎖の標的核酸と相補的な一部領域の長さは、19 ~ 31 nt であることを特徴とする請求項 2 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

【請求項 5】

1 ~ 48 個のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートまたは、ホスホロジチオエートに置換されていることを特徴とする請求項 1 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

20

【請求項 6】

前記核酸分子中第 1 鎖に含まれている 1 ~ 31 個のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートまたは、ホスホロジチオエートに置換されていることを特徴とする請求項 5 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

【請求項 7】

前記核酸分子中第 2 鎖に含まれている 1 ~ 17 個のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートまたは、ホスホロジチオエートに置換されていることを特徴とする請求項 5 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

30

【請求項 8】

前記第 1 鎖中目的核酸と相補的な領域以外の領域のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートまたは、ホスホロジチオエートに置換されていることを特徴とする請求項 7 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

【請求項 9】

前記核酸分子に含まれている少なくとも一つのヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートに置換されていることを特徴とする請求項 1 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

【請求項 10】

前記親油性化合物は、脂質、親油性ペプチド及び親油性タンパク質で構成された群から選択されたことを特徴とする請求項 1 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

40

【請求項 11】

前記脂質は、コレステロール、トコフェロールおよび、炭素数 10 以上の長鎖脂肪酸で構成された群から選択されたことを特徴とする請求項 10 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

【請求項 12】

前記親油性化合物は、前記核酸分子の第 1 鎖または第 2 鎖の末端に結合されていることを特徴とする請求項 1 に記載の RNA i 誘導用核酸分子。

【請求項 13】

前記標的核酸は、mRNA、microRNA、piRNA、コード DNA 配列及び非

50

コードDNA中いずれか一つであることを特徴とする請求項1に記載のRNAi誘導用核酸分子。

【請求項14】

前記核酸分子に含まれる少なくとも1種のヌクレオチドのリボースの2'位置のヒドロキシル基が、水素原子、フッ素原子、-O-アルキル基、-O-アシル基、及びアミノ基中いずれか一つに置き換えられることを特徴とする請求項1に記載のRNAi誘導用核酸分子。

【請求項15】

前記核酸分子に含まれる少なくとも1種のヌクレオチドのホスフェートバックボーンが、(アルキルホスホネート型)、ホスホロアミデート型、及びボラノホスフェート型中いずれか一つに置き換えられることを特徴とする請求項1に記載のRNAi誘導用核酸分子。

10

【請求項16】

前記核酸分子に含まれる少なくとも1種のヌクレオチドがLNA、UNA、モルフォリノ及びPNAの中いずれか一つに置き換えられることを特徴とする請求項1に記載のRNAi誘導用核酸分子。

【請求項17】

前記第1鎖で前記一本鎖領域を構成する塩基中少なくとも一つ以上が巨大塩基類似体を含むことを特徴とする請求項1に記載のRNAi誘導用核酸分子。

【請求項18】

前記目的核酸は、結合組織成長因子(CTGF)をコードするmRNAであり、前記RNAiを誘導する二本鎖の核酸分子は配列番号149および150の塩基対、配列番号151および152の塩基対、および配列番号153および154の塩基対で構成された群から選択された塩基対を持つことを特徴とする請求項1に記載のRNAi誘導用核酸分子。

20

【請求項19】

請求項1～18のいずれかに記載の核酸分子を含有する遺伝子発現抑制用組成物。

【請求項20】

請求項1～18のいずれかに記載の前記核酸分子を細胞内導入させる工程を含む細胞内目的遺伝子の発現抑制方法。

【請求項21】

結合組織成長因子(CTGF)をコードするmRNAを目的核酸とする請求項1～18のいずれかに記載の核酸分子を含有するCTGF関連疾病または障害の治療または予防用医薬組成物。

30

【請求項22】

前記CTGF関連疾病または障害は、ケロイド、腎臓繊維症、強皮症、肺繊維症、肝臓繊維症、関節炎、高血圧、腎臓障害、血管形成関連障害、皮膚繊維症障害および心血管系障害からなる群から選択されることを特徴とする請求項21に記載の医薬組成物。

【請求項23】

前記核酸分子に配列番号149および150の塩基対、配列番号151および152の塩基対、および配列番号153および154の塩基対で構成された群から選択された塩基対を持つことを特徴とする請求項21に記載の医薬組成物。

40

【請求項24】

結合組織成長因子(CTGF)をコードするmRNAと相補的な領域を含む第1鎖と、前記第1鎖と相補的結合を形成する第2鎖で構成されるRNAi誘導用二本鎖核酸分子において、前記核酸分子に含まれている1～31個のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートまたは、ホスホロジチオエートで置換されていて、親油性化合物が結合されていて、前記RNAiを誘導する二本鎖の核酸分子は、配列番号153および154の塩基対で構成された群から選択された塩基対を持つことを特徴とする、細胞内貫通能を持つCTGF発現抑制用核酸分子。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規構造の細胞内貫通能 (cell-penetrating ability) を持つRNAi誘導核酸分子およびその用途に関し、より詳細にはRNAiを誘導する二本鎖の核酸分子に含まれている少なくとも一つのヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエート (Phosphorothioate) または、ホスホロジチオエート (phosphorodithioate) に置換されて、親油性化合物 (lipophilic compound) が結合された構造を持つようにして、優秀な目的遺伝子抑制効率を持ちながらも別途の細胞伝達体がなくとも細胞内貫通能を持つ新しい構造の核酸分子およびこれを利用した目的遺伝子の発現抑制方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

RNA干渉 (RNA interference: RNAi) は、非常に特異的で、効率よく遺伝子発現を抑制できるメカニズムであり、これは標的遺伝子のmRNAと相同である配列を持つセンス鎖とこれと相補的な配列を持つアンチセンス鎖で構成される二本鎖RNA (dsRNA) を細胞等に導入して、標的遺伝子mRNAの分解を誘導することで標的遺伝子の発現を抑制する。

【0003】

このようなRNA干渉を誘導するsiRNAは、塩基配列特異的に標的遺伝子の発現を抑制できる短い長さ (19~21bp) の二本鎖RNAで、高い効率性と標的特異性に起因して現在治療が難しい癌、ウイルスの感染、および遺伝病など様々な疾病に対する治療剤として脚光を浴びている。siRNAを利用した効果的な治療剤開発のためには、安定性、発現抑制効率 (silencing efficiency)、免疫反応、オフターゲット効果 (off-target effects) 等解決されなければならない様々な問題点があるが、その中でもインビボでの効果的な伝達 (delivery) が最も大きい困難と指摘されている。siRNAは、ホスフェートバックボーン (phosphate backbone) 構造のために高い負の電荷を帯びており、細胞膜を通過できなく、その小さいサイズのために血液内で早く除去されて、実際の標的部位にRNAi誘導のための十分量のsiRNAを伝達するのに大きい困難を抱えている。

20

30

【0004】

現在インビトロ伝達の場合、陽イオン性脂質 (cationic lipids) と陽イオン性ポリマー (cationic polymers) を利用した高効率の伝達方法が多く開発されている (Sioud M, Sorensen DR Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. Biochem Biophys Res Commun 2003; 312: 1220-1225)。しかし、多くの場合インビボでは、インビトロほどの高い効率でsiRNAを伝達しにくく、生体内に存在する種々のタンパク質との相互作用によってsiRNAの伝達効率が減少する問題点がある (Bolcato-Bellemin AL, Bonnet ME, Creusat G, et al. Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2007; 104: 16050-16055)。また、疾病が発生する部位と関係なく、伝達ビヒクル (delivery vehicle) の組成により肝や肺のような特定臓器に高く蓄積されて毒性を誘導する問題点を持っている。

40

【0005】

一方、結合組織成長因子 (Connective tissue growth factor, CTGF/CCN2) は、マトリックス細胞 (matricellular) タンパク質の一つで、細胞の分化、成長、移行 (migration)、ECM産生 (p

50

roduction)、接着(adhesion)などで重要な役割を果たすと知られている。種々の臓器で繊維症を誘導して臓器の機能に損傷を起こす慢性線維性疾患の場合、線維性疾患が起きる組織でCTGFが過発現されることが確認され、皮膚の場合にはCTGFと繊維症の関係が比較的良好に研究されている。正常皮膚では、CTGFが基礎レベルで発現が抑制されているが、傷が発生する場合、一時的にCTGFの発現が増加することが観察された。これとは対照的に、ケロイドや局所(localized)硬化症の場合、傷の治癒以後にもCTGFの過発現がずっと維持されることが明らかになり、アンチセンスなどを利用してCTGFの発現を抑制した場合繊維症およびケロイドの生成が抑制されて、CTGFが繊維症および肥大傷跡の生成に重要な役割を果たしていることが確認された(Sisco M, Kryger ZB, O'Shaughnessy KD, et al. Antisense inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mRNA limits hypertrophic scarring without affecting wound healing in vivo. Wound Repair Regen 2008; 16: 661-673. DOI: WRR416 [pii])。病理学的には、全長CTGF分子は、結合組織細胞の過増殖および細胞外マトリックスの過剰沈着がある状態に関与すると報告されている。さらにCTGFは、血管内皮細胞移動および増殖および血管新生に関連した状態とも関連があると当業界に知られている。このような状態と関連した疾病および障害には、例えば、皮膚および重要器官の繊維症、癌、および関連疾病および障害、例えば、全身硬化症、血管形成、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性腎症および腎臓性高血圧などが挙げられる。また、CTGFは、創傷治癒、結合組織修復、骨および軟骨修復にも有用であると報告されている。このような側面から、CTGFは、骨粗しょう症、骨関節炎、または、骨軟骨炎、関節炎、骨格障害、肥厚性瘢痕、火傷、血管性肥大症、または、音(sound)治癒のような障害において、骨、組織または軟骨形成の誘導因子として記載されている(例えば、文献(米国特許第5,837,258号参照))。

【0006】

そこで、本発明者等は、インビトロおよびインビボでの効果的な伝達が可能な細胞内への貫通能を持つ新しい構造のRNAiを誘導する核酸分子を提供しようと鋭意努力した結果、RNAiを誘導する二本鎖の核酸分子に含まれている少なくとも1種のヌクレオチドのホスフェートバックボーンをホスホロチオエートで置換させて、親油性化合物をコンジュゲーションさせた場合、インビボでも別途の細胞伝達体なしに優秀な目的遺伝子抑制効率を持ちながらも優秀な細胞内貫通能を持つことを確認して、本発明を完成した。

【0007】

本背景技術の部分に記載された前記情報は、ただ本発明の背景に対する理解を向上させるためのものであって、そこに本発明が属する技術分野において通常の知識を有する者にとって既知の先行技術を形成する情報を含まないことがある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許第5,837,258号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Sioud M, Sorensen DR Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. Biochem Biophys Res Commun 2003; 312: 1220-1225

【非特許文献2】Bolcato-Bellemin AL, Bonnet ME, Creusat G, et al. Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing. Proceedings

of the National Academy of Sciences of the United States of America 2007; 104: 16050 - 16055

【非特許文献3】Sisco M, Kryger ZB, O'Shaughnessy KD, et al. Antisense inhibition of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mRNA limits hypertrophic scarring without affecting wound healing in vivo. Wound Repair Regen 2008; 16: 661 - 673. DOI: WRR416 [pii]

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、インビトロおよびインビボでの効果的な伝達が可能な細胞内への貫通能を持つ新しい構造のRNAiを誘導する核酸分子およびその用途を提供するところにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

前記目的を達成するために、本発明は、標的核酸(target nucleic acid)と相補的な領域を含む第1鎖と、前記第1鎖と相補的結合を形成する第2鎖で構成されるRNAi誘導用二本鎖核酸分子において、前記核酸分子に含まれている少なくとも一つのヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートまたは、ホスホロジチオエートで置換されていて、親油性化合物が結合されていることを特徴とする、細胞内貫通能を持つRNAi誘導用核酸分子を提供する。

20

【0012】

さらに本発明は、前記核酸分子を含有する遺伝子発現抑制用組成物を提供する。

【0013】

さらに本発明は、前記核酸分子を細胞内導入させる工程を含む細胞内目的遺伝子の発現抑制方法を提供する。

【0014】

さらに本発明は、結合組織成長因子(CTGF)をコードするmRNAを目的核酸とする前記核酸分子を含有するCTGF関連疾病または障害の治療または予防用薬学医薬組成物を提供する。

30

【0015】

さらに本発明は、結合組織成長因子(CTGF)をコードするmRNAを目的核酸とする前記核酸分子を含有する医薬組成物を投与することを含む、CTGF関連疾病または障害の治療または予防方法を提供する。

さらに本発明は、結合組織成長因子(CTGF)をコードするmRNAと相補的な領域を含む第1鎖と、前記第1鎖と相補的結合を形成する第2鎖で構成されるRNAi誘導用二本鎖核酸分子において、前記核酸分子に含まれている1~31個のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートまたは、ホスホロジチオエートで置換されていて、親油性化合物が結合されていて、前記RNAiを誘導する二本鎖の核酸分子は、配列番号149および150の塩基対、配列番号151および152の塩基対、および配列番号153および154の塩基対で構成された群から選択された塩基対を持つことを特徴とする、細胞内貫通能を持つCTGF発現抑制用核酸分子を提供する。

40

【0016】

本発明の他の特徴及び具現例は、以下の詳細な説明及び添付された特許請求の範囲からより一層明白になる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

50

【図1】表1～表3のCTGFを標的にする24種の配列に対するsiRNA、asiRNA、lasRNA構造体の遺伝子抑制効率を示したグラフである。

【図2】コレステロール改変(modification)に係るlasRNAの細胞内吸収効率増加を示した蛍光顕微鏡観察写真である。

【図3】本発明に係るコレステロールおよびPS改変されたlasRNAの構造を示した(下線:OMe改変、*:PS改変、Chol:コレステロール、Cy3: Cy3)。

【図4】ホスホチオエート(PS)改変に係るchol-lasRNAの細胞内への吸収効率増加を示した蛍光顕微鏡観察写真である。

【図5】ホスホチオエート(PS)改変に係るchol-lasRNAの遺伝子減少効果を比較したグラフである(各グラフは、3回繰り返し実験の平均とSDを示した)。

【図6】MyD88を標的にするchol-lasRNA-PS7の構造を示した(下線:OMe改変、*:PS改変、Chol:コレステロール)。

【図7】種々の細胞貫通性(cell penetrating) lasRNA(cp-lasRNA)の遺伝子抑制効率を比較したグラフである(括弧の中のCTGFまたはMyD88は、cp-lasRNAの標的遺伝子を示した)。

【図8】親油性化合物改変、すなわち疎水性改変に係る本発明に係る核酸分子の遺伝子抑制効率を示したグラフである。

【図9】アンチセンス鎖の長さに係る本発明に係る核酸分子の遺伝子抑制効率を示したグラフである。

【図10】PS2改変の構造である。

【図11】ホスフェートバックボーン改変に係る本発明に係る核酸分子の遺伝子抑制効率を示したグラフである。

【図12】本発明に係る核酸分子のインピボ標的遺伝子抑制効率を示したグラフである。

【図13】本発明に係る核酸分子の濃度別インピボ標的遺伝子抑制効率を示したグラフである。

【図14】本発明に係る核酸分子の期間別標的遺伝子抑制効率を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0018】

他の方式で定義されない限り、本明細書において使用されたあらゆる技術的・科学的用語は、本発明が属する技術分野に熟練した専門家によって通常理解されるものと同じ意味を有する。通常、本明細書において使用された命名法は、本技術分野において周知であり、しかも汎用されるものである。

【0019】

本発明の詳細な説明などにおいて使用される主な用語の定義は、下記の通りである。

【0020】

本願において「RNAi」とは、標的遺伝子のmRNAと相同である配列を持つ鎖とこれと相補的な配列を持つ鎖で構成される二本鎖RNA(dsRNA)を細胞等に導入して、標的遺伝子mRNAの分解を誘導することで標的遺伝子の発現を抑制するメカニズムを意味する。

【0021】

本願において「siRNA(small interfering RNA)」とは、配列特異的に効率的な遺伝子発現抑制(gene silencing)を媒介する短い二本鎖のRNA(dsRNA)を意味する。

【0022】

本願において「アンチセンス鎖(antisense strand)」とは、関心がある標的核酸に実質的に、または100%相補的なポリヌクレオチドであり、例えば、mRNA(messenger RNA)、mRNAでないRNA配列(例えば、microRNA、piwiRNA、tRNA、rRNA及びhnRNA)または、コードまたは、非コードDNA配列と全体として、または一部として相補的であってもよい。本願において、アンチセンス鎖及びガイド鎖は、交換されて用いられる。

10

20

30

40

50

【0023】

本願において「センス鎖 (sense strand)」とは、標的核酸と同じ核酸配列を持つポリヌクレオチドであり、mRNA、mRNAでないRNA配列（例えば、microRNA、piwiRNA、tRNA、rRNA及びhnRNA）または、コードまたは、非コードDNA配列と全体として、または一部として同じポリヌクレオチドをいう。

【0024】

本願において「遺伝子」とは、最広義の意味と見なされるべきであり、構造タンパク質または調節タンパク質を暗号化することができる。この時、調節タンパク質は転写因子、熱ショックタンパク質またはDNA/RNA複製、転写及び/または翻訳に係るタンパク質を含む。また、本発明において、発現抑制の対象になる目的遺伝子は、ウイルスゲノムに内在するもので、動物遺伝子で統合されたり染色体外の構成要素として存在することができる。例えば、目的遺伝子はHIVゲノム上の遺伝子であってもよい。この場合、siRNA分子はほ乳動物細胞内HIV遺伝子の翻訳を不活性化させるのに有用である。

10

【0025】

一観点において、本発明は、標的核酸と相補的な領域を含む第1鎖と、前記第1鎖と相補的結合を形成する第2鎖で構成されるRNAi誘導用二本鎖核酸分子において、前記核酸分子に含まれている少なくとも一つのヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートまたは、ホスホロジチオエートで置換されていて、親油性化合物が結合されていることを特徴とする、細胞内貫通能を持つRNAi誘導用核酸分子に関する。この時、第1鎖は、siRNAのアンチセンス鎖に対応して、第2鎖は、センス鎖に対応する。

20

【0026】

本発明において、前記RNAiを誘導する二本鎖の核酸分子で第1鎖は16~121nt、好ましくは24~121ntの長さであってもよい。

第1鎖は、目的核酸と相補的な一部領域を含み、この時、目的核酸と相補的な一部領域を含む領域の長さは16~31nt、19~31nt、または、19~21ntであることを特徴とする。なお、第2鎖は、13~25nt、13~21nt、または、16~21ntの長さを持つことを特徴とする。

30

【0027】

本発明において、好ましくは、前記RNAi誘導用二本鎖核酸分子は、標的核酸と相補的な一部領域を含む24~121nt長さの第1鎖と、前記第1鎖の標的核酸と相補的な一部領域と相補的結合を形成する領域を持つ13~21nt長さの第2鎖で構成されることを特徴とする。

【0028】

本発明の一実施例では、このような構造を持つ核酸分子をCTGFを標的にする24種の配列に対し作製した結果、既存のsiRNAに比べて全般的にさらに高い遺伝子発現抑制効率を示した傾向性があることを確認した。本発明者等は、前記のように第2鎖と相補的結合を形成しない長い一本鎖領域を持つRNAiを誘導する二本鎖の核酸分子、すなわち長いアンチセンス鎖を持つsiRNAを'lasiRNA'と命名した。

40

【0029】

lasiRNAは、既存のsiRNAより短い二本鎖の長さを持ちながらも高い遺伝子抑制効率を持つ新規な構造の非対称形RNAi誘導構造である。また、長いオーバーハング構造のアンチセンスの役割に起因して、siRNAやasiRNAに比べて増加した最大遺伝子抑制効率を持って、既存の構造に代わって治療剤開発に利用されると期待されている。また、他の構造に比べてさらに長いオーバーハングの長さを持って、オーバーハングの様々な改変にも高い活性を維持する特性があって、比較的多くの化学的改変の自由な導入が可能で、多様な機能を追加できる特徴がある。

【0030】

本発明において、前記第1鎖の標的核酸と相補的な一部領域の長さは、19~21nt

50

であることを特徴とする。従って、前記第1鎖は第2鎖と結合しない一本鎖領域を含み、好ましくは、第1鎖は一本鎖領域にアンチセンスDNA、アンチセンスRNA、リボザイム及びDNAザイムで構成された群から選択される核酸オリゴヌクレオチドをさらに含むことを特徴とする。

【0031】

本発明において、前記第1鎖中、第2鎖と相補的結合を形成しない一本鎖領域は、直接または、リンカーによって前記第2鎖と相補的結合を形成する領域に連結され、この時、リンカーは、化学的リンカー(chemical linker)であることを特徴とする。この時、前記化学的リンカーは、これに制限されるものではないが、核酸(nucleic acid moiety)、PNA(PNA moiety)、ペプチド(peptide moiety)、ジスルフィド結合(disulfide bond)または、ポリエチレングリコール(polyethylene glycol moiety)であることを特徴とする。

10

【0032】

また、本発明において、前記第1鎖は、一本鎖領域に前記標的核酸と相補的な配列を追加で含有するか、相補的でない配列を含有することを特徴とし、相補的な場合において、本発明に係る核酸分子の二本鎖領域、即ちsiRNAの標的核酸に相補的な領域と連続的に位置してもよく、遠く離れて位置してもよい。同様に、siRNAが標的とする配列と前記一本鎖領域のリボザイムやDNAザイムが標的とする配列は、連続的に位置してもよく、遠く離れて位置してもよい。また、前記第1鎖の一本鎖領域が前記siRNAの標的遺伝子と相補的な配列を持つ場合において、一本鎖領域に含まれる配列がアンチセンスDNAまたは、アンチセンスRNAならば、その配列とsiRNAの標的遺伝子の配列が、約70~80%以上、好ましくは約80~90%以上、さらに好ましくは約95~99%以上相補的であることを特徴とし、一本鎖領域がリボザイムまたはDNAzymeならば、その配列とsiRNAの標的遺伝子の配列が、約50~60%以上相補的であることを特徴とする。

20

【0033】

また、前記一本鎖領域は、5~100ntであってもよい。5nt以下であれば、遺伝子発現抑制効率の増加効果が充分でなく、100nt以上の場合、RNA分子の合成効率が低下する。また、前記一本鎖領域は、好ましくは9~100ntであり、または、50nt以下の長さを持つことを特徴とし、さらに好ましくは10~15ntの長さを持つことを特徴とする。

30

【0034】

本発明において、前記第1鎖で前記一本鎖領域を構成する塩基中少なくとも一つ以上が巨大(bulky)塩基類似体(base analog)を含むことを特徴とする。フェニル基を持つデオキシアデノシン(deoxyadenosine)誘導体のような巨大塩基類似体が拡張配列に含まれていれば、この拡張配列と相補的に結合するmRNA鎖は巨大塩基類似体の位置で切断(cleavage)が起きることになる。このような切断を誘導する巨大塩基類似体であれば制限なしに本発明に含まれてもよい。

40

【0035】

本発明では、siRNAのアンチセンス鎖を標的mRNA配列と相補的に長く伸ばした核酸構造体の場合、5'末端の部分は、RNAi機構として作用し、同時に3'末端の部分は、アンチセンスメカニズムとして作用するか、5'末端siRNA部分を標的mRNAに誘導する作用をすると予想した。この時、アンチセンス3'末端のmRNAに相補的な配列がDNAの場合には、リボヌクレアーゼH依存的mRNA切断を誘導することができる。また、アンチセンス3'末端の一本鎖領域を構成する塩基中少なくとも一つ以上が巨大塩基類似体を含むか、一本鎖領域がmRNAと結合してバルジ(bulge)構造を形成する場合であっても切断を誘導できると予想した。また、第1鎖の一本鎖領域にリボザイムやDNAザイムを導入した核酸分子の場合には相乗的切断(synergistic cleavage)を誘導できると予想した。

50

【0036】

19～21 nt長さのアンチセンス鎖及び13～16 ntの長さのセンス鎖で構成された*siRNA*分子として、アンチセンス鎖の5'方向の末端が平滑末端である*siRNA*構造体は、*siRNA*のセンス鎖によるオフ-ターゲット効果の発生や他の*RNAi*機構を阻害することなく優秀な標的遺伝子発現抑制効率を提供するもので（大韓民国公開特許10-2009-0065880）、このような*siRNA*に本発明に係る構造を適用させる場合、オフ-ターゲット効果を最小化しながら第1鎖の一本鎖領域に含まれる核酸オリゴヌクレオチドによる前記のような効果を同時に示すことができる。本願において「オフ-ターゲット効果」とは、本来*siRNA*は、アンチセンス鎖と相補的な配列を持つ*mRNA*の分解を誘導して、当該*mRNA*の遺伝子発現を抑制する効果を得るために用いられるものであるにもかかわらず、*siRNA*のセンス鎖によって他の*mRNA*の分解が発生する場合、センス鎖によって発生するこのような予想できない他の*mRNA*の分解乃至当該遺伝子の発現抑制効果、及び*siRNA*のアンチセンス鎖が誤ったターゲットとペアリングして他の*mRNA*の分解が発生するアンチセンス鎖による他の*mRNA*の分解が発生する当該遺伝子の発現抑制効果を全て含む。

10

【0037】

本発明の一実施例では、コレステロール改変およびPS改変を行って、コレステロールの結合が*lasRNA*の細胞貫通能を高めることが確認されたが、十分な数のPSが導入されない場合、コレステロールだけでは別途の細胞伝達体なしに効果的な標的遺伝子抑制を誘導するのに充分でないことを確認した。この時、PS改変の導入は、その導入個数に比例して細胞貫通能を高めることが明らかになったが、PS改変が多すぎる場合には*lasRNA*が*RNAi*による遺伝子抑制を誘導できないと確認された。したがって、細胞とともにインキュベートした後、遺伝子抑制効率の比較を介して最適化されたPS改変の個数を確立した。すなわち、本発明に係る核酸分子は、1～48個、好ましくは1～31個、より好ましくは2～17個、さらに好ましくは4～17個、または、12～17個のヌクレオチドのホスホペイトバックボーンがホスホロチオエートに置換されていることを特徴とする。

20

【0038】

この時、前記核酸分子中第1鎖に含まれているヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートに置換されていることを特徴とし、また、前記第1鎖中目的核酸と相補的な領域以外の領域のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートに置換されていることを特徴とする。この時、第1鎖に含まれている1～31個、好ましくは1～17個、より好ましくは2～17個、さらに好ましくは4～17個、または、12個～17個のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートに置換されていることを特徴とする。なお、前記核酸分子中第2鎖に含まれている1～21個、好ましくは1～17個、より好ましくは2～17個、さらに好ましくは4～17個、または、12個～17個のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートに置換されていることを特徴とする。

30

【0039】

この時、本発明の他の実施例では、PSの代わりに図10のようなPS2改変を利用してもPSよりは減少した遺伝子抑制効能を示すが、従来*siRNA*構造に比べて向上した遺伝子抑制効率を持つてくることを確認することができた。そこで、本発明に係る核酸分子は、一つ以上のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートに置換されていることを特徴とし、この時、好ましくは1～48個、より好ましくは1～31個、より一層好ましくは2～17個、さらに好ましくは4～17個、または、12～17個のヌクレオチドのホスフェートバックボーンが置換されていることを特徴とし、この時、第1鎖の1～31個、好ましくは1～17個、より好ましくは2～17個、さらに好ましくは4～17個、または、12個～17個のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがホスホロチオエートに置換されているか、第2鎖の1～17個、より好ましくは2～17個、さらに好ましくは4～17個、または、12個～17個のヌクレオチドのホスフ

40

50

エートバックボーンがホスホロジチオエートに置換されていることを特徴とする。

【0040】

本発明において、親油性化合物は、疎水性改変をもたらすものであり、例えば、脂質、親油性ペプチドまたは親油性タンパク質などを利用することができる。この時、脂質としてはこれに制限されるものではないが、コレステロール、トコフェロールおよび、ステアリン酸、パルミチン酸などのような炭素数10以上の長鎖脂肪酸などを利用することを特徴とする。なお、これに制限されるものではないが、前記コレステロールなどの親油性化合物は、前記核酸分子の第1鎖または第2鎖の5'末端または、3'末端に結合されてもよい。

【0041】

本発明において、前記標的核酸は、これに限定されるものではないが、mRNA、microRNA、piRNA (piwi-interacting RNA)、コードDNA配列及び非コードDNA配列等であってもよい。

【0042】

本発明の核酸分子は、一般に合成されたものであるが、これに限定されない。即ち、本発明において、前記核酸分子は、化学的または、酵素学的に合成されたものであってもよい。本発明のsiRNA分子は、標準組換え技法によって天然 (naturally occurring) 遺伝子から誘導することができるが、この場合、発現を変化させる標的遺伝子のmRNAの少なくとも一部分とヌクレオチド配列水準で実質的に相補的であることを特徴とする。

【0043】

そこで、本発明に係る核酸分子は、化学的改変を含むことを特徴とする。前記化学的改変において、前記核酸分子に含まれる少なくとも1種のヌクレオチドのリボースの2'位置のヒドロキシル基が、水素原子、フッ素原子、-O-アルキル基、-O-アシル基、及びアミノ基中どれか一つに置き換えられることを特徴とするが、これに制限されることなく核酸分子の伝達能を高めるなら、-Br、-Cl、-R、-R'OR、-SH、-SR、-N₃及びCN (R=アルキル基、アリアル基、アルキレン基) 中いずれか一つに置き換えられてもよい。また、前記化学的改変において、少なくとも1種のヌクレオチドのホスフェートバックボーンがアルキルホスホネート型 (alkylphosphonate form)、ホスホロアミデート型 (phosphoramidate form)、及びボラノホスフェート型 (boranophosphate form) 中いずれか一つに置き換えられてもよい。また、前記化学的改変は、前記核酸分子に含まれる少なくとも1種のヌクレオチドがLNA (locked nucleic acid)、UNA (unlocked nucleic acid)、モルフォリノ (Morpholino)、PNA (peptide nucleic acid) 中いずれか一つに置き換えられることを特徴とし、前記化学的改変は、前記核酸分子が、脂質、細胞貫通性ペプチド及び細胞標的リガンドで構成された群から選択される一つ以上と結合することを特徴とする。

【0044】

なお、本発明に係る核酸分子は、既にオリゴヌクレオチドを細胞内に効果的に伝達するものと知られている、リポソーム、陽イオン性ポリマー、抗体、アプタマー、ナノ粒子などの種々の伝達体および伝達方法と共に用いられて効率的にインビトロおよびインビボ伝達のために用いることができる。

【0045】

一方、本発明の一実施例では、別途の伝達体がなくともPBSのような溶液に溶かして注射することだけでインビボで標的部位に90%以上の高い遺伝子抑制効率を示して、本発明に係る核酸分子が別途の剤形化過程がなくとも注射剤形態の薬品に直ちに開発が可能であることを確認することができた。

【0046】

本発明の実施例は、本発明に係るRNAiを誘導する核酸分子が効率的に目的遺伝子発

10

20

30

40

50

現抑制効果を持っていることを提示しており、また他の観点において、本発明は、前記RNAi誘導用核酸分子を含有する遺伝子発現抑制用組成物に関する。この時、前記核酸分子は前記細胞伝達体が結合された核酸複合体の形態で含まれても良い。

【0047】

本発明の実施例では、目的遺伝子としてCTGFをターゲットとするsiRNAに対し本発明に係る核酸分子を適用させてその抑制効率が優秀で貫通能が優秀であることを確認したが、本発明に係る核酸分子構造は、その他の標的遺伝子をターゲットにする核酸分子を提供した場合にも同様の結果が得られることは、本発明が属する技術分野において通常の知識を有する者には自明である。

【0048】

一方、前記遺伝子発現抑制用組成物は遺伝子発現抑制用キットの形態で提供できる。遺伝子発現抑制用キットは瓶、タブ(tub)、小袋(sachet)、エンベロープ(envelope)、チューブ、アンプル(ampoule)等のような形態であってもよく、これらは部分的にまたは全体的にプラスチック、ガラス、紙、ホイル、ワックスなどから形成される。容器は、最初は容器の一部であるか、または機械的、接着性、またはその他の手段によって、容器に付着できる、完全にまたは部分的に分離可能な栓を取り付けることができる。容器はまた注射針によって内容物に接近できる、ストッパーが取り付けられる。前記キットは外部パッケージを有することができ、外部パッケージは構成要素の使用に関する使用説明書を含んでもよい。

【0049】

また他の観点において、本発明は、前記RNAiを誘導する核酸分子を利用して細胞内標的遺伝子の発現を抑制させる方法に関する。即ち、前記RNAiを誘導する核酸分子を細胞内に導入させる段階を含む細胞内標的遺伝子の発現抑制方法に関する。

【0050】

本発明において、前記RNAiを誘導する核酸分子の第1鎖は、標的遺伝子のmRNA配列に相補的であることを特徴とする。

【0051】

本発明において、前記標的遺伝子は内因性(endogenous)遺伝子であるか導入遺伝子(transgene)であってもよい。

【0052】

この時、本発明に係る核酸分子は、必ずしも合成siRNAに制限されなく、細胞内で発現ベクター等を利用して発現するsiRNAやshRNAにも適用可能な長所がある。即ち、本発明に係る核酸分子は、細胞内で発現させることによって標的遺伝子の発現を抑制させることができる。従って、また他の観点において、本発明は、前記RNAiを誘導する核酸分子を細胞内で発現させる段階を含む細胞内標的遺伝子の発現抑制方法に関する。

【0053】

一方、本発明に係る核酸分子は、結合組織成長因子(CTGF)をコードするmRNAを目的核酸にしてもよい。本発明の一実施例では、本発明に係る構造の核酸分子を導入することによってCTGF発現を抑制することを確認した。従って、また他の観点において、本発明は、前記核酸分子を含有するCTGF関連疾病または障害の治療または予防用医薬組成物に関する。さらに本発明は、結合組織成長因子(CTGF)をコードするmRNAを目的核酸とする前記核酸分子を含有する医薬組成物を投与することを含む、CTGF関連疾病または障害の治療または予防方法に関する。

【0054】

それだけでなく、局所疾患に対する治療剤以外にも本発明に係る核酸分子は既に知らされた様々な細胞特異的な抗体、アダプター、リガンドなどを共に用いて、望む部位でだけ遺伝子抑制効果を示す遺伝子調節治療剤の開発が可能であると期待される。

【0055】

本発明に係る医薬組成物は、前記RNAiを誘導する核酸分子を単独で含んだり一つ以

10

20

30

40

50

上の医薬的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を含んで医薬組成物で提供でき、前記核酸分子は疾患及びこれの重症程度、患者の年齢、体重、健康状態、性別、投与経路及び治療期間等により適切な医薬的に有効な量で医薬組成物に含まれる。

【0056】

前記において「医薬的に許容される組成物」とは、生理学的に許容され、ヒトに投与される時、通常胃腸障害、めまいのようなアレルギー反応またはこれと類似する反応を起こさない組成物のことをいう。前記担体、賦形剤及び希釈剤としては、例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、澱粉、アカシアゴム、アルジネート、ゼラチン、磷酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、水、ヒドロキシ安息香酸メチル、ヒドロキシ安息香酸プロピル、マグネシウムステアレート及び鉱物油が挙げられる。

10

【0057】

前記医薬組成物は、充填剤、抗凝集剤、潤滑剤、湿潤剤、香料、乳化剤及び防腐剤等をさらに含んでもよい。また、本発明の医薬組成物は、ほ乳動物に投与された後、活性成分の迅速、持続または遅延放出を提供できるように当業界に公示された方法を使って、剤形化される。剤形は滅菌注射溶液などの形態でありうる。

【実施例】

【0058】

以下、本発明を実施例を挙げて詳述する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に制限されないことは当業者において通常の知識を有する者にとって自明である。

20

【0059】

実施例1：CTGFをターゲットとしたRNAiを誘導する二本鎖の核酸分子のスクリーニング

効果的な自己伝達 (self delivery) 構造のための種々の化学的改変の導入に先立ち、CTGFを標的にする高効率のRNAiを誘導する二本鎖の核酸分子を確保するために、CTGFに対する50種の標的配列をデザインした後、スクリーニング (screening) を進行した。

【0060】

lasRNAと既存RNAi誘導構造体とのCTGF遺伝子抑制効率を比較するために、表1～表3のように、各塩基配列を標的にするsiRNA、asiRNA、lasRNA構造体を合成した。表1～表3はCTGFに対する24種の配列に対するsiRNA、asiRNA、lasRNA構造体の塩基配列情報である (大文字：RNA、小文字：DNA)。各塩基配列および構造のCTGF mRNA発現抑制効果をテストするために、各構造をHaCaT (ATCC) に10nMでトランスフェクションした後、リアルタイムPCRでCTGF mRNA発現程度を測定した。

30

【0061】

【表 1】

No	siRNA NAME	SEQ	Sequence (5' →3')	
No1	siRNA	1	sense	GCGAGGAGUGGGUGUGAtt
		2	antisense	UCCUCGCAGCAUUCCCGGtt
	asiRNA	3	sense	AGGAGUGGGUGUGUGA
		4	antisense	UCCUCGCAGCAUUCCCGGtt
	lasiRNA	5	sense	AGGAGUGGGUGUGUGA
		6	antisense	UCACACACCCACUCCUCGCAGCAUUCCCGG
No2	siRNA	7	sense	AGACCUUGGGGAUGGGCAUtt
		8	antisense	CAGGUCUUGGAACAGGCGctt
	asiRNA	9	sense	CCUGUGGGGAUGGGCAU
		10	antisense	CAGGUCUUGGAACAGGCGctt
	lasiRNA	11	sense	CCUGUGGGGAUGGGCAU
		12	antisense	AUGCCCAUCCACAGGUCUUGGAACAGGCGC
No3	siRNA	13	sense	ACAGGAAGAUUACGGAGAtt
		14	antisense	UUCUGUAGUACAGCGAUtt
	asiRNA	15	sense	GGAAGAUGUACGGAGA
		16	antisense	UUCUGUAGUACAGCGAUtt
	lasiRNA	17	sense	GGAAGAUGUACGGAGA
		18	antisense	UCUCCGUACAUCUCCUGUAGUACAGCGAUU
No4	siRNA	19	sense	GCACCAGCAUGAAGACAUAtt
		20	antisense	UAUGUCUUCAUGCUGGUGctt
	asiRNA	21	sense	CCAGCAUGAAGACAU
		22	antisense	UAUGUCUUCAUGCUGGUGctt
	lasiRNA	23	sense	CCAGCAUGAAGACAU
		24	antisense	UAUGUCUUCAUGCUGGCCAGCCAGAAAGCU
No5	siRNA	25	sense	GAAGACAUACCGAGCUAAAtt
		26	antisense	UUUAGCUCGGUAUGUCUUCtt
	asiRNA	27	sense	GACAUACCGAGCUAAA
		28	antisense	UUUAGCUCGGUAUGUCUUCtt
	lasiRNA	29	sense	GACAUACCGAGCUAAA
		30	antisense	UUUAGCUCGGUAUGUCUUCAUGCUGGUGCAG

10

20

30

No6	siRNA	31	sense	GCUAAAUCUGUGGAGUAUtt	10	
		32	antisense	AUACUCCACAGAAUUUAGCtt		
	asiRNA	33	sense	AAAUUCUGUGGAGUAU		
		34	antisense	AUACUCCACAGAAUUUAGCtt		
	lasiRNA	35	sense	AAAUUCUGUGGAGUAU		
		36	antisense	AUACUCCACAGAAUUUAGCUCGGUAUGUCUU		
No7	siRNA	37	sense	GCGAGGUCAUGAAGAAGAAtt		20
		38	antisense	UUGUUCUUCAUGACCUCGCtt		
	asiRNA	39	sense	AGGUCAUGAAGAAGAA		
		40	antisense	UUGUUCUUCAUGACCUCGCtt		
	lasiRNA	41	sense	AGGUCAUGAAGAAGAA		
		42	antisense	UUGUUCUUCAUGACCUCGCCGUCAGGGCACU		
No8	siRNA	43	sense	UGGAAGAGAACAUAAGAAtt	20	
		44	antisense	UUCUUAUGUUCUCUCCAtt		
	asiRNA	45	sense	AAGAGAACAUAAGAA		
		46	antisense	UUCUUAUGUUCUCUCCAtt		
	lasiRNA	47	sense	AAGAGAACAUAAGAA		
		48	antisense	UUCUUAUGUUCUCUCCAGGUCAGCUUCGC		

(大文字：RNA、小文字：DNA)

【 0 0 6 2 】

【表 2】

No	siRNA NAME	Sequence (5' →3')	
No9	siRNA	(49) sense	CGGCUUACCGACUGGAAGAtt
		(50) antisense	UCUUCCAGUCGGUAAGCCGtt
	asiRNA	(51) sense	CUUACCGACUGGAAGA
		(52) antisense	UCUUCCAGUCGGUAAGCCGtt
	lasiRNA	(53) sense	CUUACCGACUGGAAGA
		(54) antisense	UCUUCCAGUCGGUAAGCCGCGAGGGCAGGCC
No10	siRNA	(55) sense	GCAUGAAGCCAGAGAGUGAtt
		(56) antisense	UCACUCUCUGGCUUCAUGCtt
	asiRNA	(57) sense	UGAAGCCAGAGAGUGA
		(58) antisense	UCACUCUCUGGCUUCAUGCtt
	lasiRNA	(59) sense	UGAAGCCAGAGAGUGA
		(60) antisense	UCACUCUCUGGCUUCAUGCCCAUGUCUCCGU
No11	siRNA	(61) sense	CACCAUAGGUAGAAUGUAAtt
		(62) antisense	UUACAUUCUACCUAUGGUGtt
	asiRNA	(63) sense	CAUAGGUAGAAUGUAA
		(64) antisense	UUACAUUCUACCUAUGGUGtt
	lasiRNA	(65) sense	CAUAGGUAGAAUGUAA
		(66) antisense	UUACAUUCUACCUAUGGUGUUCAGAAUUGA
No12	siRNA	(67) sense	CCUGCAGGCUAGAGAAGCAtt
		(68) antisense	UGCUUCUCUAGCCUGCAGGtt
	asiRNA	(69) sense	GCAGGCUAGAGAAGCA
		(70) antisense	UGCUUCUCUAGCCUGCAGGtt
	lasiRNA	(71) sense	GCAGGCUAGAGAAGCA
		(72) antisense	UGCUUCUCUAGCCUGCAGGAGGCGUUGUCAU
No13	siRNA	(73) sense	CCAGAGAGUGAGAGACAUUtt
		(74) antisense	AAUGUCUCUCACUCUCUGGtt
	asiRNA	(75) sense	GAGAGUGAGAGACAUU
		(76) antisense	AAUGUCUCUCACUCUCUGGtt
	lasiRNA	(77) sense	GAGAGUGAGAGACAUU
		(78) antisense	AAUGUCUCUCACUCUCUGGCUUCAUGCCAUG
No14	siRNA	(79) sense	GCGAAGCUGACCUGGAAGAtt
		(80) antisense	UCUUCCAGGUCAGCUUCGctt
	asiRNA	(81) sense	AAGCUGACCUGGAAGA
		(82) antisense	UCUUCCAGGUCAGCUUCGctt
	lasiRNA	(83) sense	AAGCUGACCUGGAAGA
		(84) antisense	UCUUCCAGGUCAGCUUCGCAAGGCCUGACCA

10

20

30

40

No15	siRNA	(85) sense	CCGGAGACAAUGACAUCUUt
		(86) antisense	AAGAUGUCAUUGUCUCCGGtt
	asiRNA	(87) sense	GAGACAAUGACAUCUU
		(88) antisense	AAGAUGUCAUUGUCUCCGGtt
	lasiRNA	(89) sense	GAGACAAUGACAUCUU
		(90) antisense	AAGAUGUCAUUGUCUCCGGGACAGUUGUAAU
No16	siRNA	(91) sense	UCUUUGAAUCGCUGUACUAt
		(92) antisense	UAGUACAGCGAUUCAAAAGAtt
	asiRNA	(93) sense	UUGAAUCGCUGUACUA
		(94) antisense	UAGUACAGCGAUUCAAAAGAtt
	lasiRNA	(95) sense	UUGAAUCGCUGUACUA
		(96) antisense	UAGUACAGCGAUUCAAAAGAUGUCAUUGUCUC

(大文字：RNA、小文字：DNA)

【 0 0 6 3 】

【表 3】

No	siRNA NAME	SEQ ID NO	Sequence (5' → 3')	
No17	siRNA	97	sense	UUGCGAAGCUGACCUUGGAAtt
		98	antisense	UUCCAGGUCAGCUUCGCAAtt
	asiRNA	99	sense	CGAAGCUGACCUUGGAA
		100	antisense	UUCCAGGUCAGCUUCGCAAtt
	lasiRNA	101	sense	CGAAGCUGACCUUGGAA
		102	antisense	UUCCAGGUCAGCUUCGCAAGGCCUGACCAUG
No18	siRNA	103	sense	CAACUAUGAUUAGAGCCAAtt
		104	antisense	UUGGCUCUAAUCAUAGUUGtt
	asiRNA	105	sense	CUAUGAUUAGAGCCAA
		106	antisense	UUGGCUCUAAUCAUAGUUGtt
	lasiRNA	107	sense	CUAUGAUUAGAGCCAA
		108	antisense	UUGGCUCUAAUCAUAGUUGGGUCUGGGCCAA
No19	siRNA	109	sense	GUACCAGUGCACGUGCCUGtt
		110	antisense	CAGGCACGUGCACUGGUActt
	asiRNA	111	sense	CCAGUGCACGUGCCUG
		112	antisense	CAGGCACGUGCACUGGUActt
	lasiRNA	113	sense	CCAGUGCACGUGCCUG
		114	antisense	CAGGCACGUGCACUGGUACUUGCAGCUGCUC
No20	siRNA	115	sense	AGUGCAUCCGUACUCCCAAtt
		116	antisense	UUGGGAGUACGGAUGCACUtt
	asiRNA	117	sense	GCAUCCGUACUCCCAA
		118	antisense	UUGGGAGUACGGAUGCACUtt
	lasiRNA	119	sense	GCAUCCGUACUCCCAA
		120	antisense	UUGGGAGUACGGAUGCACUUUUUGCCCUUCU
No21	siRNA	121	sense	CAUGAUGUUCAUCAAGACctt
		122	antisense	GGUCUUGAUGAACAUCAUGtt
	asiRNA	123	sense	GAUGUUCAUCAAGACC
		124	antisense	GGUCUUGAUGAACAUCAUGtt
	lasiRNA	125	sense	GAUGUUCAUCAAGACC
		126	antisense	GGUCUUGAUGAACAUCAUGUUCUUCUUCAUG
No22	siRNA	127	sense	CCAUGACCGCCGCCAGUAUtt
		128	antisense	AUACUGGCGGCGGUCAUGGtt
	asiRNA	129	sense	UGACCGCCGCCAGUAU
		130	antisense	AUACUGGCGGCGGUCAUGGtt
	lasiRNA	131	sense	UGACCGCCGCCAGUAU
		132	antisense	AUACUGGCGGCGGUCAUGGUUGGCACUGCGG

10

20

30

40

No23	siRNA	133	sense	GAACAUUAAGAAGGGCAAAtt
		134	antisense	UUUGCCCUUCUUAUGUUCtt
	asiRNA	135	sense	CAUUAAGAAGGGCAAA
		136	antisense	UUUGCCCUUCUUAUGUUCtt
	lasiRNA	137	sense	CAUUAAGAAGGGCAAA
		138	antisense	UUUGCCCUUCUUAUGUUCUCCAGGUCA
No24	siRNA	139	sense	GGAAGACAGUUUGGCCAtt
		140	antisense	UGGGCCAAACGUGUCUUCctt
	asiRNA	141	sense	AGACACGUUUGGCCA
		142	antisense	UGGGCCAAACGUGUCUUCctt
	lasiRNA	143	sense	AGACACGUUUGGCCA
		144	antisense	UGGGCCAAACGUGUCUCCAGUCGGUAAGCC

(大文字：RNA、小文字：DNA)

10

20

30

40

50

【0064】

すなわち、HaCat細胞を100mmペトリ皿に10%ウシ胎仔血清(Gibco)、100μg/mLペニシリン/ストレプトマイシンを添加したダルベコ改変イーグル培地(Gibco)で培養した。HaCatの場合、トランスフェクションする直前に、12ウェルプレートに 8×10^4 個の細胞を播種した。一方、前記siRNA、asiRNA、lasiRNAの場合、1×siRNAデュプレックスバッファー(duplex buffer)(Bioesang Co., Ltd.)に適切な濃度で希釈して90分で2分、37で1時間インキュベートした。アニーリングされたsiRNAは、10%ポリアクリルアミドゲルに電気泳動した後、EtBrで5分染色してUVトランスイルミネーターを介してバンドを確認した。これらは、リポフェクタミン(Lipofectamine)2000(Invitrogen)で提供する取扱説明書に基づいてsiRNAをトランスフェクションした後、24時間後にmRNAレベルを測定した。

【0065】

この時、トランスフェクション後、Isol-RNA溶解試薬(lysis reagent)(5PRIME)を用いて全RNAを抽出し、そのうち500ngのRNAをcDNA合成に用いた。cDNAは、大容量cDNA逆転写キット(High-capacity cDNA reverse transcription kit)(Applied Biosystems)を利用して提供されたプロトコルに基づいて合成された。合成されたcDNAは、希釈を介して濃度を低くした後、ステップワンリアルタイムPCRシステム(step one real-time PCR system)(Applied Biosystems)を利用して提供されたプロトコルに基づいて、定量的なリアルタイムPCRに利用した。標的遺伝子は、遺伝子に特異的なプライマーと共にパワーSYBRグリーンPCRマスターミックス(power SYBR green PCR master Mix)(Applied Biosystems)を利用して確認した。実験に用いられたプライマー塩基配列は次のとおりである。

【0066】

GAPDH - forward 5' - GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT - 3' (配列番号145)

GAPDH - reverse 5' - GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG - 3' (配列番号146)

CTGF - forward 5' - CAA GGG CCT CTT CTG TGA CT - 3' (配列番号147)

CTGF - reverse 5' - ACG TGC ACT GGT ACT TGC AG - 3' (配列番号148)

【0067】

24個の塩基配列に対するスクリーニングの結果、図1に示したように、合計24個の塩基配列中14個の配列でlasiRNAがsiRNAに比べて増加した活性(lasi

RNAがsiRNA対比20%以上増加した遺伝子抑制効率を示した場合)を持つことが確認されて、5種の配列ではlasRNAに比べてさらに高い遺伝子抑制効率を示すことが明らかになり、lasRNAが既存のsiRNAに比べて全般的にさらに高い遺伝子発現抑制効率を示した傾向性を確認することができた。

【0068】

特に、90%以上の遺伝子抑制効率を示すsiRNAとlasRNAに対するIC50測定の結果、9番と16番塩基配列を標的にするlasRNAが最も低いIC50を持つことが確認されたが、この中で改変と自己伝達実験のための最終候補群として9番塩基配列を選び、これは下記の表4のとおりである。

【0069】

10

【表4】

No. 9のRNAi誘導二本鎖核酸分子

No	siRNA name	Sequence (5' → 3')		配列一覧
No9	siRNA	sense	CGGCUUACCGACUGGAAGAtt	149
		antisense	UCUCCAGUCGGUAAGCCGtt	150
	asiRNA	sense	CUUACCGACUGGAAGA	151
		antisense	UCUCCAGUCGGUAAGCCGtt	152
	lasRNA	sense	CUUACCGACUGGAAGA	153
		antisens	UCUCCAGUCGGUAAGCCGCGAGGGCAGGCC	154

20

(大文字：RNA、小文字：DNA)

【0070】

実施例2：本発明に係る核酸分子の製造および細胞内取り込み収率の測定

2-1：コレステロール改変に係る影響

先に、コレステロール改変が、lasRNAの伝達に及ぼす影響を調べるために、lasRNAセンス鎖、すなわち第2鎖の5'末端をcy3で標識した後、コレステロール有無に係る取り込み差を蛍光顕微鏡で確認した。すなわち、HeLa細胞にcy3で標識したlasRNAまたはchol-lasRNA構造体を1μMでインキュベートした後、3時間後に蛍光顕微鏡で観察して細胞内に伝達された程度を比較した。

30

【0071】

先に、HeLa細胞(ATCC)を100mmペトリ皿に10%ウシ胎仔血清(Gibco)、100μg/mLペニシリン/ストレプトマイシンを添加したダルベコ改変イーグル培地(Gibco)で培養した。

【0072】

コレステロール改変させたlasRNAは、それぞれの一本鎖Accell siRNAデリバリー培地(single strand Accell siRNA delivery media)(Thermo scientific)に適切な濃度で希釈して使い、コレステロールが適用された一本鎖は、アニーリング前に90℃で20~30秒間インキュベートした後用いた。センス鎖とアンチセンス鎖を混合した後、90℃で30秒、37℃で1時間インキュベートして、アニーリングされたsiRNAは、10%ポリアクリルアミドゲルに電気泳動した後、EtBrで5分染色後、UVトランスイルミネーターを介してバンドを確認した。

40

【0073】

インキュベーションテストのために、lasRNAを処理する24時間前にカバーグラスボトムディッシュ(Cover glass-bottom dish)(SPL)に2×10⁵個のHeLa細胞を播種した。準備された皿の培養培地除去後、2mLの1×DPBSで二回洗浄した。37℃ウォーターバスで予め暖めておいたAccell siRNAデリバリー培地(Thermo scientific)100μLに希釈して準備しておいたsiRNAを入れて培養した。3時間後、Accell培地を除去して1×

50

DPBSで二回洗浄した後、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のHoechst 33343 (Sigma) (Opti-MEM (Gibco)中)で37℃で10分間インキュベートして核を染色した。Hoechst除去後、 $1\times$ DPBS (Gibco)で二回洗浄した後、Opti-MEM培地に入れて顕微鏡 (Microscope - Olympus IX81、software - MetaMorph)で細胞の蛍光を観察した。

【0074】

その結果、図2に示したように、コレステロール改変によるlasRNAの細胞内への吸収効率を確認した結果、コレステロールがない場合には細胞内でcy3蛍光がほとんど観察されなかったが、lasRNAにコレステロールを結合したlasRNA-cho1の場合には非常に強い蛍光を示すことが分かった。

10

【0075】

これはlasRNA構造がコレステロール改変を介して細胞内伝達 (intracellular delivery)が増加することを示した。

【0076】

2-2: PS改変に係る影響

追加的に、ホスホロチオエートを直接siRNAに導入する改変を行う場合、lasRNAの取り込み効率を増加させるのか確認するために、コレステロールを結合させたcho1-lasRNAのアンチセンス鎖、すなわち第1鎖の3'オーバーハングにPS改変を導入して、PS改変に係るcho1-lasRNAの取り込み効率変化をテストした。HeLa細胞にcy3で標識したcho1-lasRNA-PS(N)構造体を $1\mu\text{M}$ でインキュベートした後、3時間後に蛍光顕微鏡で観察して細胞内に伝達された程度を比較した。構造体間の細胞貫通能の正確な比較のために、cho1-lasRNA-PS0が最小限の蛍光を見せる条件をセット後、他の構造体の蛍光強度を比較した。

20

【0077】

これのために図3のように、cho1-lasRNAのアンチセンス3'末端を始め、0、4、7、12、17のPS改変を導入した後、HeLa細胞と共にインキュベートまたはトランスフェクションして、実施例2-1のように蛍光顕微鏡でPS改変の個数に係る伝達効率の差を観察した。図3で、下線および赤色はOMe改変を、*はPS改変を、cho1はコレステロールを、Cy3はCy3蛍光物質を示す。

30

【0078】

その結果、図4に示したように、PS改変がないcho1-lasRNA-PS0の場合HeLa細胞で蛍光がほとんど観察されなく、他のサンプルに比べて低い取り込み効率を示すことが確認された。

【0079】

なお、lasRNAのアンチセンス鎖、すなわち第1鎖にPS改変が増加するほど明るい蛍光を示すことが確認され、全サンプル中PSが各12、17個の改変されたcho1-lasRNA-PS12、cho1-lasRNA-PS17が最も明るい蛍光を示したことが確認されて、cho1-lasRNAにPS改変個数を増加させるほど内部化 (internalized)されたlasRNAの量が増加することが確認された。

40

【0080】

実施例3: CTGF発現抑制効率測定

実施例2でCy3-標識化lasRNAを利用した内部化 (internalization)実験の結果、lasRNA構造にコレステロールとPS改変を直接導入して伝達ビヒクルや追加的な試薬がなくともlasRNAの効果的な細胞内伝達が可能であることが確認された。しかし、siRNAに種々の化学的改変を導入する場合、siRNAの活性を多少減少させたり、改変によりsiRNAの活性が急激に減少すると知られているが、各改変がlasRNAの活性に及ぼす影響を調べるために、多様な構造のlasRNAをHeLa細胞にトランスフェクションした後、CTGF mRNAの発現変化を測定して、各改変がlasRNAの遺伝子発現抑制に及ぼす影響を測定した。

50

【0081】

PS 変換が *lasiRNA* の遺伝子抑制効率に及ぼす影響を確認するために、様々な構造の PS 変換 *lasiRNA* [*chol-lasiRNA-PS(N)*] を *HeLa* 細胞にトランスフェクションした後、CTGF 遺伝子の発現抑制効率を測定した。すなわち、*HeLa* 細胞に *chol-lasiRNA-PS(N)* 構造体を 10 nM でトランスフェクションした後、48 時間後にリアルタイム PCR で CTGF mRNA の発現程度を測定した。

【0082】

次に、実験時間 24 時間前に 24 ウェルプレートに 2.5×10^4 個の *HeLa* 細胞を播種した後、プロトコルに基づいて、リポフェクタミン 2000 を利用して、各 *lasiRNA* をトランスフェクションした。その後 48 時間の間、5% CO₂ インキュベーターで培養した後、実施例 1 の方法により mRNA レベルの発現を測定した。

【0083】

その結果、図 5 に示したように、アンチセンス鎖に PS 変換が増加するにつれて遺伝子抑制効率が減少する傾向を示し、アンチセンスに 12 個以上の PS 変換を導入した場合、若干の発現抑制活性の減少が観察された。アンチセンスに 17 個の変換を導入した *chol-lasiRNA-PS17* の場合、遺伝子抑制効率が急激に減少して、CTGF に対する発現抑制効果をほとんど示さないことが確認されてアンチセンスに PS は最大 17 個の以下で用いることが好ましくアンチセンス鎖にそれ以上の PS 変換は自己伝達のための変換では適さないことを確認することができた。図 5 で、各グラフは、3 回繰り返し実験の平均と SD を示した。

【0084】

追加的に、PS 変換の増加は、*chol-lasiRNA* の自己細胞伝達効率を増加させるが、同時にその程度により *lasiRNA* の発現抑制活性を減少させる問題点がある。ビヒクルなしで最適の発現抑制を誘導する変換構造を確立するために、多様な個数の PS 変換を持つ *chol-lasiRNA-PS(N)* 構造を *HeLa* と共にインキュベートした後、CTGF mRNA レベルを測定して遺伝子抑制効率を比較した。この時、0.1 μM、0.3 μM、および 1 μM の濃度で各 *lasiRNA* を処理し、MyD88 を標的にする *chol-lasiRNA-PS7* (図 6、赤色：OMe 変換、*：PS 変換、Chol：コレステロール) を対照群として共に用いた。すなわち、*HeLa* 細胞に CTGF または MyD88 を標的にする *chol-lasiRNA-PS(N)* 構造体を共にインキュベートした後、48 時間後にリアルタイム PCR で CTGF mRNA の発現程度を測定した。

【0085】

その結果、図 7 に示したように、*chol-lasiRNA-PS4* の場合には最も高い濃度である 1 μM でも約 55% 程度の遺伝子抑制効率しか示すことができないことが明らかになり、*chol-lasiRNA-PS7*、*chol-lasiRNA-PS12* の場合、1 μM で CTGF の発現を約 95% 以上抑制することを確認することができた。より正確な遺伝子抑制効率比較のために、さらに低い濃度で各構造体をインキュベートした後、CTGF mRNA レベルを測定した結果では、PS 12 が低い濃度でも最も効率的に CTGF 遺伝子の発現を抑制することが明らかになった。*chol-lasiRNA-PS17* は、トランスフェクションした場合と同様に高い濃度 (1 μM) でインキュベートした場合でも 50% 程度の遺伝子発現抑制効果しか持つことができないことが確認されて、導入する PS 変換の数が多すぎるよりは伝達の増加と silencing activity の減少に係る適当な PS 変換個数の最適化が必要であることを確認することができた。また、MyD88 を標的にする *chol-lasiRNA-PS7* の場合には CTGF に対する遺伝子抑制効率が全く現れないので、*cp-lasiRNA* 構造体による遺伝子発現抑制が塩基配列特異的に起きることを確認することができた。

【0086】

実施例 4：他の親油性化合物変換に係る細胞内取り込み収率の測定

10

20

30

40

50

コレステロール以外に他の親油性化合物改変 (lipophilic modification) (すなわち、疎水性化合物改変 (hydrophobic modification)) を用いる場合の影響を調べるために、次の配列でサバイビン (survivin) を目的遺伝子にした本発明に係る cp-lasiRNA (cell penetrating lasiRNA) を製造した。この時、cp-lasiRNA-1はコレステロールが結合されたもので、cp-lasiRNA-2はコレステロールの代わりに該当位置にトコフェノールを結合したもので、cp-lasiRNA-3はコレステロールの代わりにセンス鎖の5'位置にステアリン酸を結合したものである。

【0087】

<cp-lasiRNA (survivin) 31mer>

cp-lasiRNA (survivin) Antisense 31nt: 5' UGA
AA AUG UGA UC UCCUUUCCUAAGA *C*A*T*T 3' (配列番号
169)

cp-lasiRNA (survivin) Sense: 5' GAGAUCAACA UU
UU *C*A*cholesterol. 3' (配列番号170)

下線: OMe改変、*: PS (ホスホオチオエート結合)

【0088】

A549細胞株(ATCC)に前記cp-lasiRNA-1、cp-lasiRNA-2、cp-lasiRNA-3をそれぞれ300mMで実施例2と同様にインキュベートした後、24時間後にリアルタイムPCRでサバイビンmRNAの発現程度を測定した。各2回繰り返し実験の平均とSDを図8に示した。

【0089】

トランスフェクション後、Isol-RNA溶解試薬(5PRIME)を用いて全RNAを抽出して、そのうちの500ngのRNAをcDNA合成に用いた。cDNAは、大容量cDNA逆転写キット(Applied Biosystems)を利用して提供されたプロトコルに基づいて合成された。合成されたcDNAは、希釈を介して濃度を低くした後、ステップワンリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を利用して提供されたプロトコルに基づいて、定量的なリアルタイムPCRに利用した。標的遺伝子は、遺伝子に特異的なプライマーと共にパワーSYBRグリーンPCRマスターミックス(Applied Biosystems)を利用して確認した。実験に用いられたプライマー塩基配列は下記のとおりである。

【0090】

Survivin

Forward 5' - GCA CCA CTT CCA GGG TTT AT - 3' (配列
番号172)

Reverse 5' - CTC TGG TGC CAC TTT CAA GA - 3' (配列
番号173)

【0091】

その結果、図8に示したように、コレステロールを他の疎水性改変を誘導した場合にも高い効率で標的遺伝子を抑制する可能性があることを確認した。また、ステアリン酸の場合、センス鎖の5'末端に結合させたのにも係らず高い遺伝子抑制効率を示して本発明に係る核酸分子は、様々な位置に疎水性改変、すなわち親油性化合物を結合させた場合にも目的とする効果を得ることができることを確認した。

【0092】

実施例5: アンチセンス鎖の長さに係る標的遺伝子抑制効率調査

本発明に係る核酸分子の第1鎖の長さに係る標的遺伝子抑制効率を調べるために、同じ16ntの第2鎖(センス鎖)に31ntアンチセンスまたは21ntのアンチセンスを組み合わせてcp-lasiRNAを作った後A549細胞株に処理した。

【0093】

<cp-lasiRNA (survivin) 31mer>

10

20

30

40

50

cp-lasiRNA(survivin) Antisense 31nt: 5' UGA
AA AUGUUGAUCUCCUUUCCUAAGA* C* A* T* T 3' (配列番号
169)

cp-lasiRNA(survivin) Sense: 5' GAGAUCAACAUU
UU* C* A* cholesterol. 3' (配列番号170)

<cp-lasiRNA(survivin) 21mer>

cp-lasiRNA(survivin) Antisense 21nt: 5' UGA
AA AUGUUGAUCUCCU* U* U* C* C 3' (配列番号171)

cp-lasiRNA(survivin) Sense: 5' GAGAUCAACAUU
UU* C* A* cholesterol. 3' (配列番号170)

10

下線: OMe 改変、* : PS (ホスホロチオエート結合)

<cp-lasiRNA(CTGF) 31mer>

cp-lasiRNA(CTGF) Antisense 31nt: 5' UCUUCCA
GUCGGUAAGCCGCGAGGGCA* G* G* C* C 3' (配列番号174)

cp-lasiRNA(CTGF) Sense: 5' CTTACCGACTGGAA* G
* A* chol. 3' (配列番号175)

<cp-lasiRNA(CTGF) 21mer>

cp-lasiRNA(CTGF) Antisense 21nt: 5' UCUUCCA
GUCGGUAAGC* C* G* C* G 3' (配列番号176)

cp-lasiRNA(CTGF) Sense: 5' CTTACCGACTGGAA* G
* A* chol. 3' (配列番号175)

20

下線: OMe 改変、* : PS (ホスホロチオエート結合)

【0094】

すなわち、A549細胞株(ATCC)に前記核酸分子をそれぞれ実施例1と同様の方法でトランスフェクションするか、実施例2と同様にインキュベートした後、24時間後にリアルタイムPCRで標的遺伝子mRNAの発現程度を測定した。各2回繰り返し実験の平均とSDを図9に示した。図9Aは、21merアンチセンスを持つCTGF標的cp-lasiRNAの遺伝子抑制効率を、9Bは、31merアンチセンスを持つCTGF標的cp-lasiRNAの遺伝子抑制効率を、9Cは、21merアンチセンスを持つサバイピン標的cp-lasiRNAの遺伝子抑制効率を、9Dは、21merアンチ

30

センスを持つサバイピン標的cp-lasiRNAの遺伝子抑制効率を示した。CTGFは、実施例1のプライマーを利用して抑制効率を測定して、サバイピンは、実施例4のプライマーを利用して抑制効率を測定した。

図9に示したように、CTGFを標的とするcp-lasiRNAの場合、トランスフェクションとインキュベート共に31ntアンチセンスを持つ場合が21ntアンチセンスを持つ場合よりさらに高い標的遺伝子抑制効率を示し(図9A-B)、サバイピンを標的とするcp-lasiRNAをインキュベートした場合にも同様に31ntアンチセンスの標的遺伝子抑制効率が高く観察されることを確認した。すなわち、本発明に係る核酸分子は、19nt~31ntの様々な長さのアンチセンス、すなわち第1鎖を持つ核酸分子のデザインが可能で、これを利用して効果的に標的遺伝子抑制が可能であるが、31nt

40

【0095】

実施例6: PS2改変に係る効果確認

核酸分子中一つ以上のヌクレオチドホスフェートバックボーンをホスホロチオエートに改変させたこと以外に図10のような構造のホスホロジチオエート(PS2)に改変する場合、効果を下記の通り調べた。

【0096】

すなわち、A549細胞株に下記のcp-lasiRNA(Survivin)および下記のcp-lasiRNA(Survivin)において同じ位置でPS改変の代わり

50

にPS2改変を導入したcp-lasiRNA(Survivin)-PS2を実施例1または2と同様の方法でトランスフェクションまたはインキュベートした後、24時間後に実施例4と同様の方法でリアルタイムPCRを行ってサバイビン遺伝子の発現程度を測定した。それぞれ2回繰り返し実験して、グラフに繰り返し実験の平均とSDを示した。

【0097】

<cp-lasiRNA(survivin)>

cp-lasiRNA(survivin)Antisense 31nt:5'UGAA
AA AUGUUGAUCUCCUUUCCUAAGA*C*A*T*T 3'(配列番号
169)

cp-lasiRNA(survivin)Sense:5'GAGAUCAACAUU
UU*C*A*cholesterol.3'(配列番号170)

下線:OMe改変、*:PS(ホスホロチオエート結合又はホスホロジチオエート結合)

【0098】

その結果、図11に示したように、追加的なイオウ改変(sulfur modification)(PS2)による向上した遺伝子抑制効果は観察されなく、既存のcp-lasiRNAより減少した遺伝子抑制効果を示すことが確認された。

【0099】

実施例7:本発明に係る核酸分子のインビボターゲットでの遺伝子抑制効率測定

現在RNAi技術を利用した治療剤開発で最も困難なことの一つは、インビボでの効果的なRNA伝達技術の開発である。現在開発されている多くの伝達体技術をこのインビボ上では、高い効率を持つ反面、インビボに適用された場合、その効率が顕著に減少する問題点を有している。これに対して、本発明に係る核酸分子がインビボでも高い遺伝子抑制効果を持つのか確認するために、別途の伝達体を用いることなくcp-lasiRNAだけをラットの皮膚に注射して標的遺伝子の発現抑制効果を比較した。

【0100】

すなわち、ラットの皮膚にPBS、siRNA(CTGF)、cp-lasiRNA(CTGF)、またはcp-lasiRNA(Scrambled)を図12に表記された濃度のおり100µLのPBSに溶解して皮内注射した後、24h後に組織を回収して標的遺伝子の発現効率を測定した。この時、ゾレチル(Zoletil)及びロンパン(rompun)溶液をラットの腹腔に注射して、麻酔後ラット(SDラット、オリエンバイオ)の背中部分を全除毛した。除毛された部位の皮膚に半径5mmの円を描いた後、中心部位にインスリンシリンジ(insulin syringe)(BD、31G)で100µLのPBS、siRNA、またはcp-lasiRNAを皮内注射した。注射後、表記された日に8mm生検パンチ(biopsy punch)で皮膚組織を切り離して遺伝子発現分析を行った。用いられた核酸分子は下記のとおりである。

【0101】

cp-lasiRNA(CTGF)Antisense Rat:5'-UCUCCA
GUCGGUAGGCAGCUAGGCA*G*G*G*C-3'(配列番号177)

cp-lasiRNA(CTGF)Sense Rat:5'-CCTACCGACTG
GAA*G*A*cholesterol.3'(配列番号178)

下線:OMe改変、*:PS(ホスホロチオエート結合)

siRNAとしては下記を利用した。

siRNA(CTGF)antisense:5'-CUGCCUACCGACUGGA
AGATT-3'(配列番号179)

siRNA(CTGF)sense:5'-CUGCCUACCGACUGGAAGAT
T-3'(配列番号180)

下線:OMe改変

【0102】

この時、RNeasy線維性組織ミニキット(RNeasy Fibrous tissue mini kit)(Qiagen)を用いてRNAを抽出し、合計1µgのR

10

20

30

40

50

NAをcDNA合成に用いた。cDNAは、大容量cDNA逆転写キット(Applied Biosystems)を利用して提供されたプロトコルに基づいて合成された。合成されたcDNAは、希釈を介して濃度を低くした後、ステップワンリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を利用して提供されたプロトコルに基づいて、定量的なリアルタイムPCRに利用した。標的遺伝子は、遺伝子に特異的なプライマーと共にパワーSYBRグリーンPCRマスターミックス(Applied Biosystems)を利用して確認した。実験に用いられたプライマー塩基配列は下記のとおりである。図12で各グラフは5回繰り返し実験の平均とSDを示した。

【0103】

CTGF-Rat

Forward 5' - GGC TCG CAT CAT AGT TG - 3' (配列番号181)

Reverse 5' - CGG GAA ATG CTG TGA GGA GT - 3' (配列番号182)

【0104】

ラットの皮膚にPBS、siRNA(CTGF)、cp-lasiRNA(CTGF)、またはcp-lasiRNA(Scrambled)を表記された濃度のおり100 μ LのPBSに溶解して皮内注射した後、24時間後に組織を回収して標的遺伝子の発現効率を測定した。各グラフは、5回繰り返し実験の平均とSDを示した。

【0105】

その結果、図12に示したように、PBS、cp-lasiRNA(scrambled)、またはsiRNA(CTGF)を処理した群に比べてcp-lasiRNA(CTGF)を処理した群でCTGFの発現が80~90%以上減少して、cp-lasiRNAがインビボでも高い効率で標的遺伝子抑制が可能であることを確認した。

【0106】

追加的に、cp-lasiRNAのインビボで遺伝子抑制効率を確認するために、前記と同様の方法で100 μ g/インジェクション~0.1 μ g/インジェクション区間のcp-lasiRNAをラットに注射した後、標的遺伝子の発現を測定した。

【0107】

その結果、図13に示したように、cp-lasiRNA(CTGF)は、約0.3 μ g/インジェクションの低い濃度でも70%以上の高い標的遺伝子抑制効率を持つことが確認され、約0.21 μ g/インジェクションのIC50値を持つことが確認された。各グラフは2回繰り返し実験の平均とSDを示した。

【0108】

追加的に、前記と同様の方法でcp-lasiRNA(CTGF)注射した後、1日、2日、3日、6日目に組織を分析して遺伝子発現を測定した。すなわち、1日目でcp-lasiRNA(CTGF)を皮内注射した後、表記された日に組織を切り離して、CTGFの発現をリアルタイムPCRで確認した。

【0109】

その結果、図14に示したように、cp-lasiRNA(CTGF)は少なくとも5日以上標的遺伝子の発現を抑制することが確認された。各グラフは、2回繰り返し実験の平均とSDを示した。

【産業上の利用可能性】

【0110】

以上説明した通り、本発明に係る核酸分子構造は、コレステロール改変およびホスホリチオエート改変を共に導入することによって、優秀な遺伝子抑制効率を維持しながらも別途の細胞伝達体がなくとも細胞内貫通能を持つことができ、実際の標的部位にRNAi誘導のための十分な量に伝達できて、従来問題になったインビボ伝達問題を解消させることができる。そこで、本発明に係る核酸分子は、従来of siRNA分子に代えてsiRNAを利用した癌やウィルス感染治療などに活用することができて有用である。

10

20

30

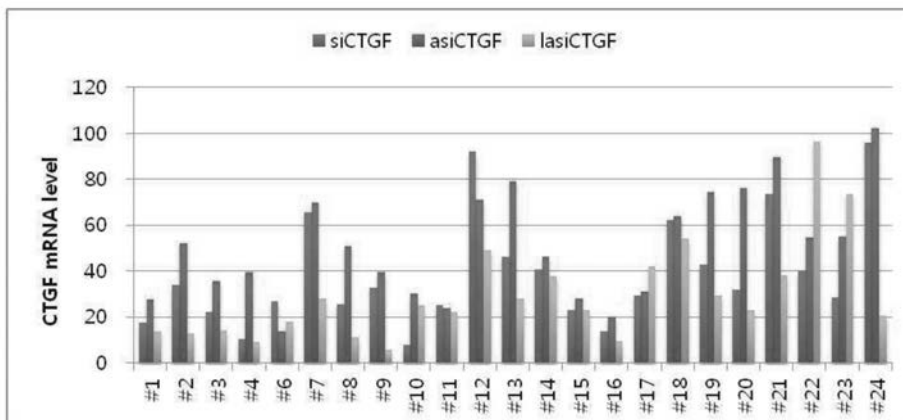
40

50

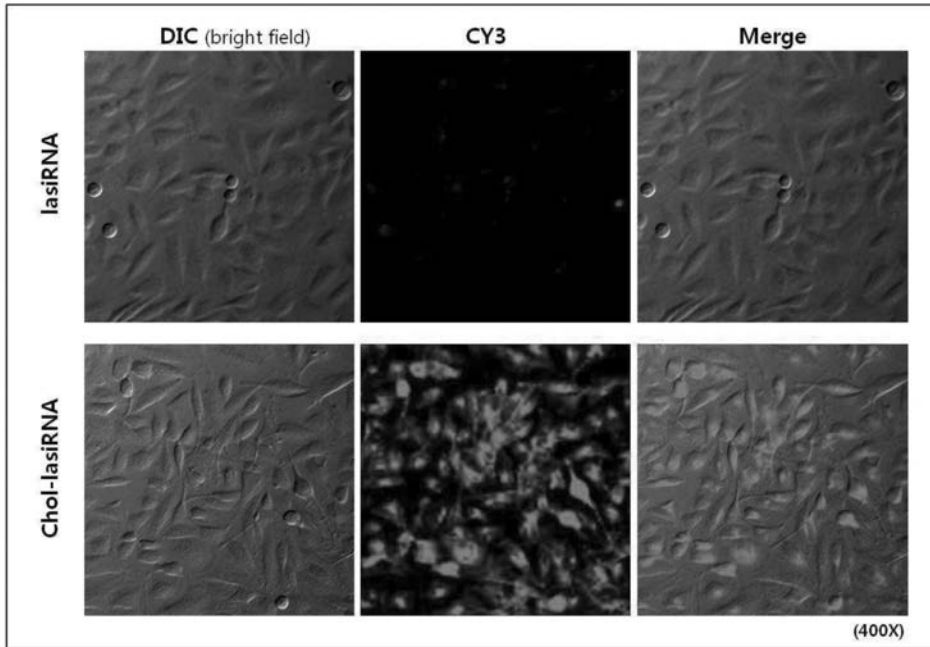
【 0 1 1 1 】

以上、本発明の内容の特定の部分を詳述したが、当業界における通常の知識を持った者にとって、このような具体的な記述は単なる好適な実施態様に過ぎず、これにより本発明の範囲が制限されることはないという点は明らかである。よって、本発明の実質的な範囲は特許請求の範囲とこれらの等価物により定義されると言える。

【 図 1 】



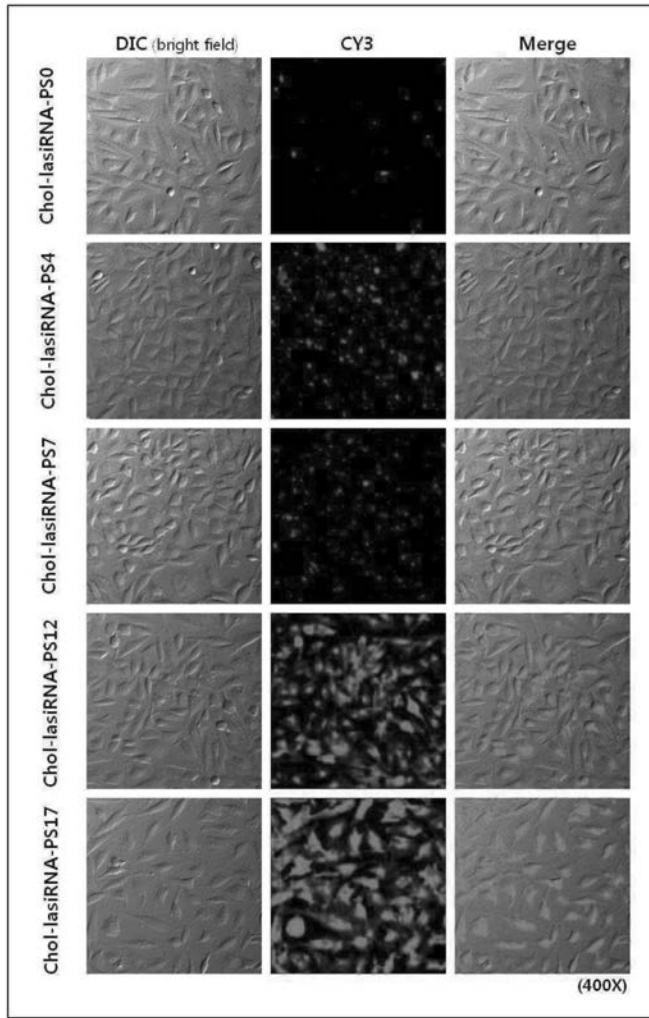
【 図 2 】



【 図 3 】

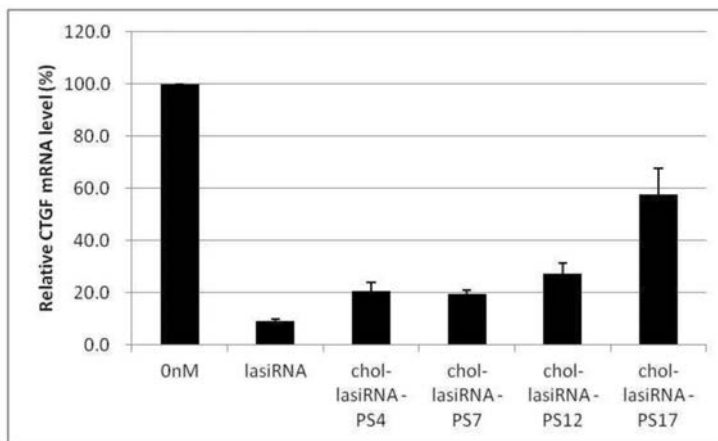
No	siRNA NAME	SEQ ID NO	Sequence (5'→3')	
No9	Chol-lasi-PS(0)	155	sense	CUUACCGACUGGAA*G*A*Cho1
		156	antisense	UCUUCCAGUCGGUAAGCCGCGAGGGCAGGCC
	Chol-lasi-PS(4)	157	sense	CUUACCGACUGGAA*G*A*Cho1
		158	antisense	UCUUCCAGUCGGUAAGCCGCGAGGGCA*G*G*C*C
	Chol-lasi-PS(7)	159	sense	CUUACCGACUGGAA*G*A*Cho1
		160	antisense	UCUUCCAGUCGGUAAGCCGCGAGG*G*C*A*G*G*C*C
	Chol-lasi-PS(12)	161	sense	CUUACCGACUGGAA*G*A*Cho1
		162	antisense	UCUUCCAGUCGGUAAGCCG*C*G*A*G*G*G*C*A*G*G*C*C
	Chol-lasi-PS(17)	163	sense	CUUACCGACUGGAA*G*A*Cho1
		164	antisense	UCUUCCAGUCGGUA*A*G*C*C*G*C*G*A*G*G*G*C*A*G*G*C*C
	Chol-lasi-PS(7)-cy3	165	sense	Cy3*CUUACCGACUGGAA*G*A*Cho1
		166	antisense	UCUUCCAGUCGGUAAGCCGCGAGG*G*C*A*G*G*C*C

【 図 4 】



5

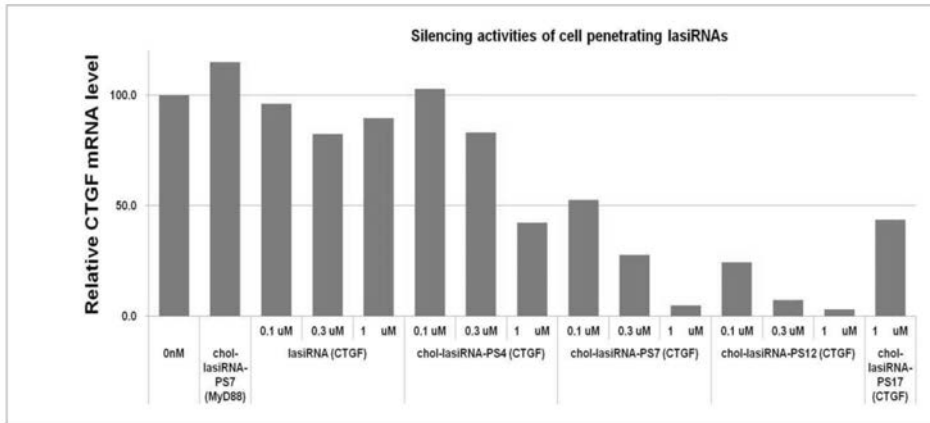
【 図 5 】



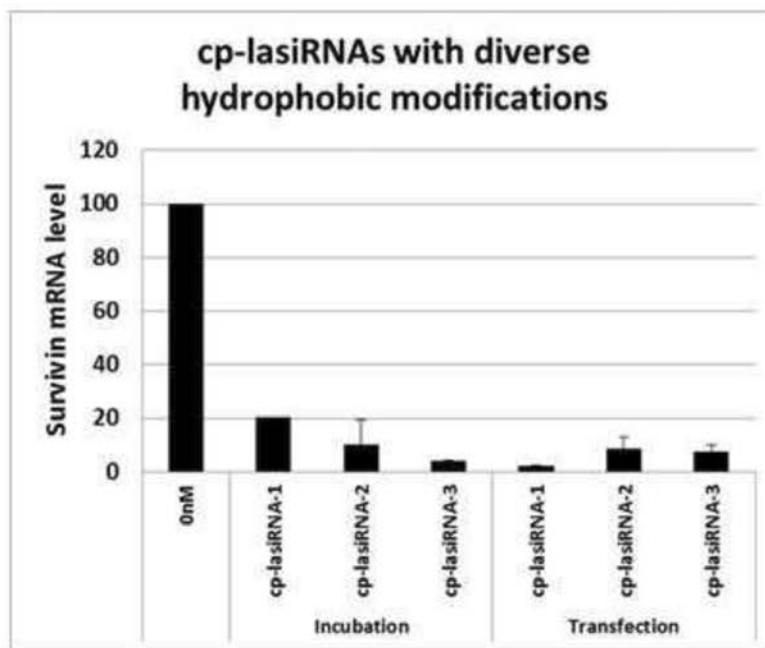
【 図 6 】

No	siRNA NAME	SEQ ID NO	Sequence (5'→3')	
MyD88	Chol-lasiRNA-PS(7)	167	sense	CCAGACCAAUUUG*C*A*Chol
		168	antisense	UGC AAAUUUGGUCUGGAAGUCACA*U*U*C*C*U*U*G

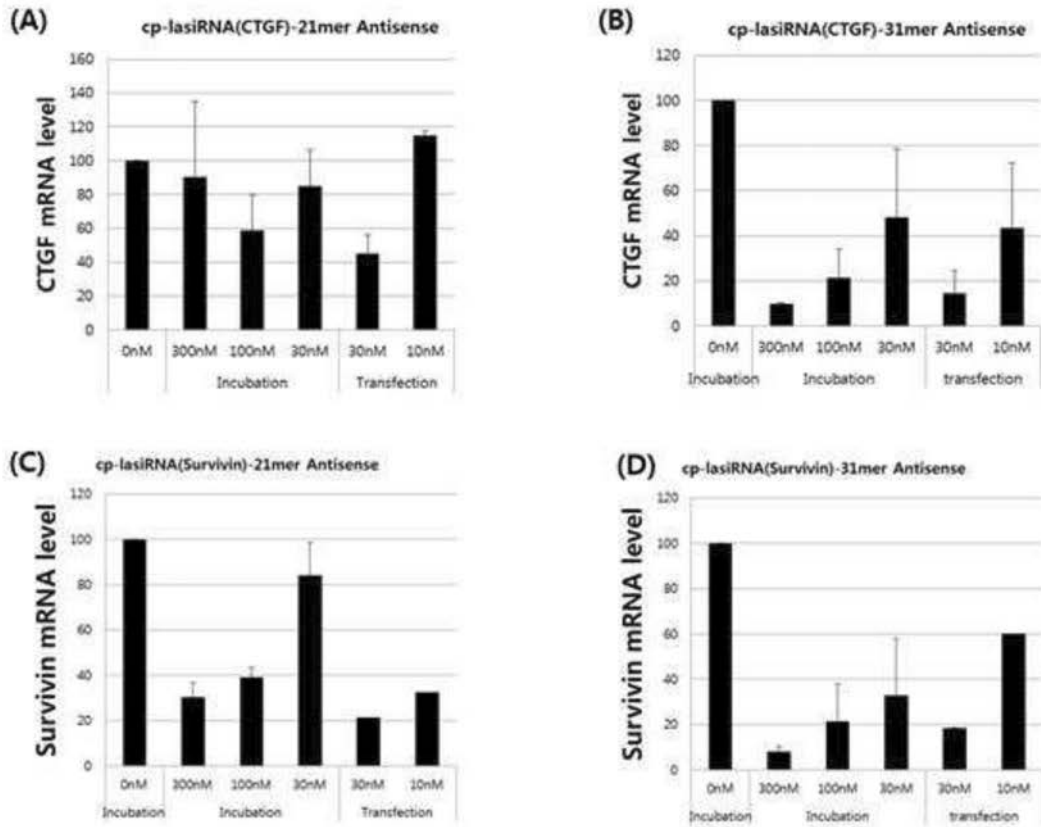
【 図 7 】



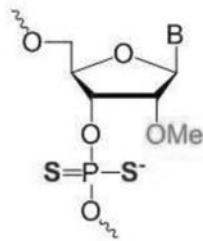
【 図 8 】



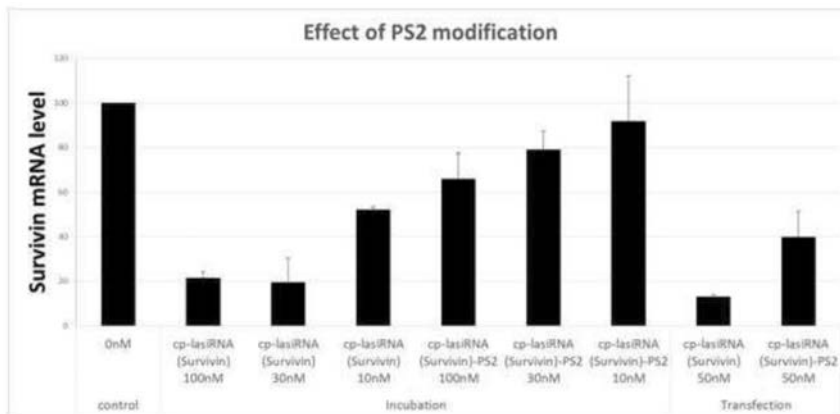
【 図 9 】



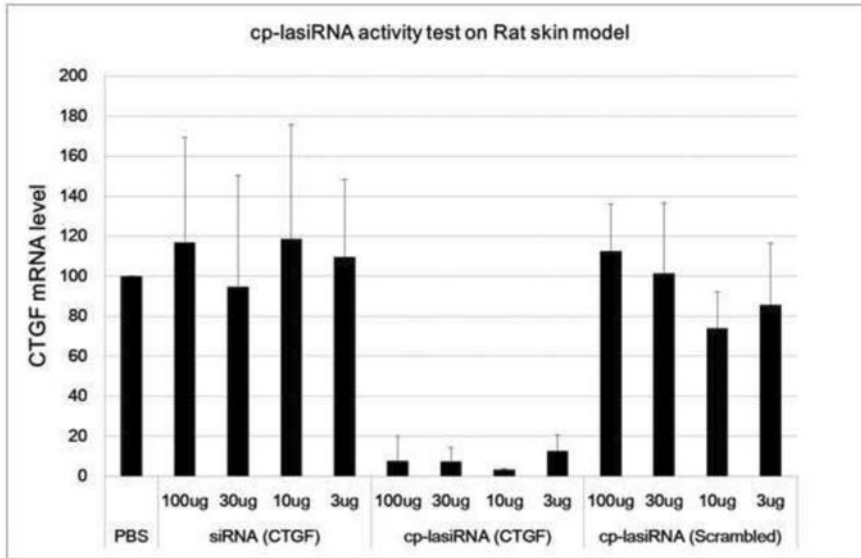
【 図 10 】



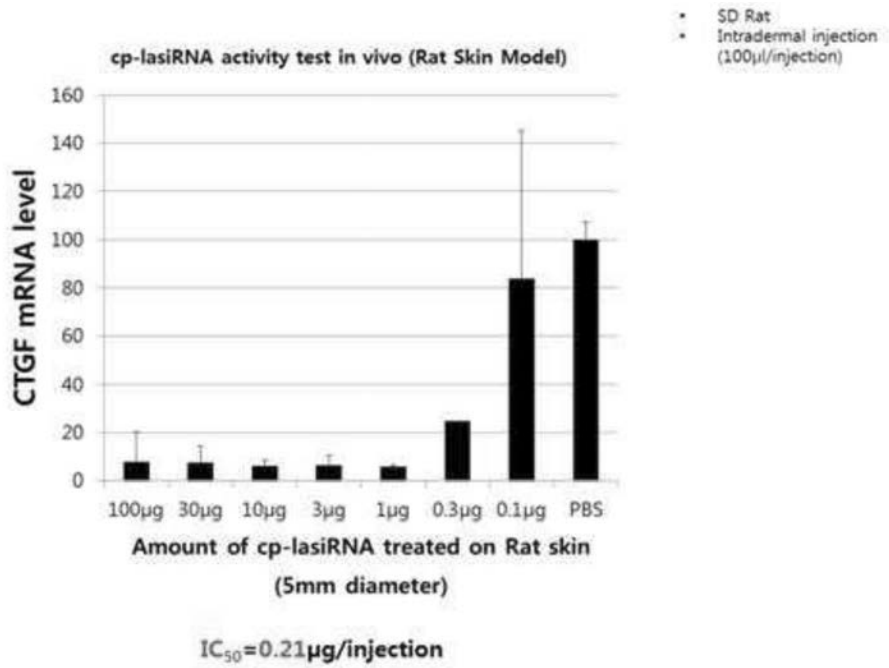
【 図 11 】



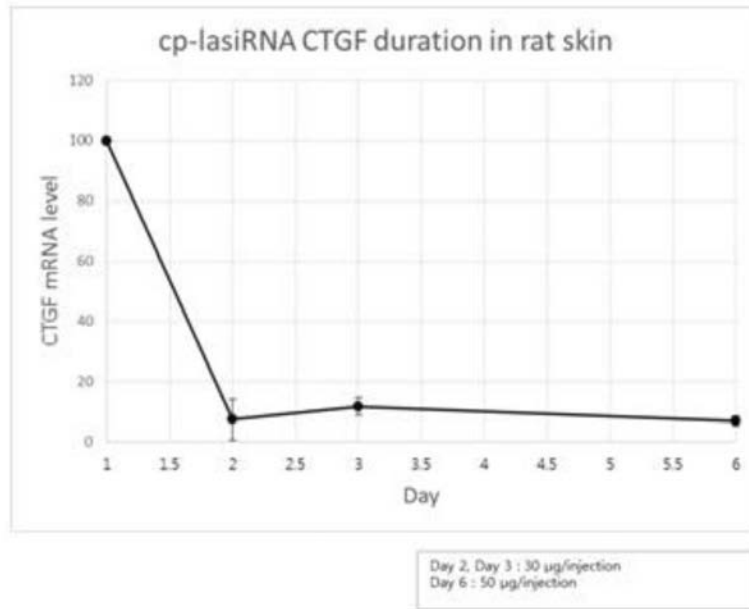
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】




【 図 1 4 】



【 配 列 表 】

[2015518721000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2013/004463
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 15/113(2010.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/113; C07H 21/00; A61P 11/08; A61K 48/00; A61K 31/7088; A61K 31/713; C12N 15/63 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: RNAi, siRNA, transcellular, phosphate backbone, phosphorothioate, phosphorothioate, phosphorodithioate, phosphorodithioate, lipophilic compound, blunt end, connective tissue growth factor, CTGF		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012-053741 A2 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 26 April 2012	1-17,19
Y	See abstract; paragraph [60]; claims 1, 4-7, 13-18, 22 and 24.	18,21-24
Y	US 2005-0119202 A1 (KREUTZER, Ronald et al.) 02 June 2005 See claims 62 and 65.	18,21-24
Y	GenBank Accession Number AY890732, 21 March 2005 See the entire document.	18,23,24
Y	US 2011-0237648 A1 (KHVOROVA, Anastasia et al.) 29 September 2011 See claims 3, 7, 30, 32, 33 and 38.	18,21-24
Y	US 2012-0016011 A1 (PICKERING, Victoria et al.) 19 January 2012 See claims 30-37.	18,21-24
Y	LI, Guanming et al., "Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats", The Journal of Gene Medicine, July 2006, vol. 8, no. 7, pages 889-900 See abstract; pages 893 and 894.	18,21-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 SEPTEMBER 2013 (16.09.2013)		Date of mailing of the international search report 17 SEPTEMBER 2013 (17.09.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seons-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/004463

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LUO, G. H. et al., "Inhibition of connective tissue growth factor by small interfering RNA prevents renal fibrosis in rats undergoing chronic allograft nephropathy", Transplantation Proceedings, September 2008, vol. 40, no. 7, pages 2365-2369 See abstract; page 2367.	18,21-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/004463**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 20 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/004463

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2012-053741 A2	26/04/2012	CA 2818662 A1	26/04/2012
		KR 10-2012-0042645 A	03/05/2012
		WO 2012-053741 A3	14/06/2012
		WO 2012-053741 A9	02/08/2012
US 2005-0119202 A1	02/06/2005	JP 2005-506087 A	03/03/2005
		US 2004-0248835 A1	09/12/2004
		WO 03-035876 A1	01/05/2003
US 2011-0237648 A1	29/09/2011	AU 2009-293658 A1	25/03/2010
		CA 2743981 A1	25/03/2010
		CA 2746527 A1	25/03/2010
		CA 2753338 A1	25/03/2010
		CN 102405286 A	04/04/2012
		EP 2340309 A2	06/07/2011
		EP 2340310 A2	06/07/2011
		EP 2342340 A1	13/07/2011
		IL 211863 D0	30/06/2011
		JP 2012-502657 A	02/02/2012
		JP 2012-502991 A	02/02/2012
		US 2011-237522 A1	29/09/2011
		US 2011-263680 A1	27/10/2011
		US 2012-040459 A1	16/02/2012
		WO 2010-033246 A1	25/03/2010
		WO 2010-033247 A2	25/03/2010
		WO 2010-033247 A3	03/06/2010
WO 2010-033248 A2	25/03/2010		
WO 2010-033248 A3	17/06/2010		
US 2012-0016011 A1	19/01/2012	EP 2408916 A2	25/01/2012
		JP 2012-520683 A	10/09/2012
		WO 2010-107952 A2	23/09/2010
		WO 2010-107952 A3	11/11/2010

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2013/004463

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/113(2010.01), C12N 15/63(2006.01), A61K 48/00(2006.01)		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/113; C07H 21/00; A61P 11/08; A61K 48/00; A61K 31/7088; A61K 31/713; C12N 15/63 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: RNAi, siRNA, 세포 관통, 포스페이트 백본, 포스포로티오에이트, phosphorothioate, 포스포로다티오에이트, phosphorodithioate, 친유성 화합물, blunt end, 결합 조직 성장 인자, CTGF		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2012-053741 A2 (성균관대학교산학협력단) 2012.04.26 요약; 문단 [60]; 청구항 1, 4-7, 13-18, 22 및 24 참조.	1-17, 19
Y		18, 21-24
Y	US 2005-0119202 A1 (KREUTZER, ROLAND 외 4명) 2005.06.02 청구항 62 및 65 참조.	18, 21-24
Y	GenBank Accession Number AY890732, 2005.03.21 문서 전체 참조.	18, 23, 24
Y	US 2011-0237648 A1 (KHVOROVA, ANASTASIA 외 5명) 2011.09.29 청구항 3, 7, 30, 32, 33 및 38 참조.	18, 21-24
Y	US 2012-0016011 A1 (PICKERING, VICTORIA 외 2명) 2012.01.19 청구항 30-37 참조.	18, 21-24
Y	LI, GUANMING 외 8명, `Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats`, The Journal of Gene Medicine, 2006.07, 8권, 7호, 889-900 페이지 요약; 페이지 893 및 894 참조.	18, 21-24
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 " & " 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 09월 16일 (16.09.2013)	국제조사보고서 발송일 2013년 09월 17일 (17.09.2013)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150	

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2013/004463

C(계속) 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	LUO, G.H. 외 5명, `Inhibition of connective tissue growth factor by small interfering RNA prevents renal fibrosis in rats undergoing chronic allograft nephropathy`, Transplantation Preceedings, 2008.09, 40권, 7호, 2365-2369 페이지 요약; 페이지 2367 참조.	18,21-24

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2013/004463

제2기제란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: 20
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
제 20항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(IV)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기제란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않교도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2013/004463

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2012-053741 A2	2012/04/26	CA 2818662 A1 KR 10-2012-0042645 A WO 2012-053741 A3 WO 2012-053741 A9	2012/04/26 2012/05/03 2012/06/14 2012/08/02
US 2005-0119202 A1	2005/06/02	JP 2005-506087 A US 2004-0248835 A1 WO 03-035876 A1	2005/03/03 2004/12/09 2003/05/01
US 2011-0237648 A1	2011/09/29	AU 2009-293658 A1 CA 2743981 A1 CA 2746527 A1 CA 2753338 A1 CN 102405286 A EP 2340309 A2 EP 2340310 A2 EP 2342340 A1 IL 211863 D0 JP 2012-502657 A JP 2012-502991 A US 2011-237522 A1 US 2011-263680 A1 US 2012-040459 A1 WO 2010-033246 A1 WO 2010-033247 A2 WO 2010-033247 A3 WO 2010-033248 A2 WO 2010-033248 A3	2010/03/25 2010/03/25 2010/03/25 2010/03/25 2012/04/04 2011/07/06 2011/07/06 2011/07/13 2011/06/30 2012/02/02 2012/02/02 2011/09/29 2011/10/27 2012/02/16 2010/03/25 2010/03/25 2010/06/03 2010/03/25 2010/06/17
US 2012-0016011 A1	2012/01/19	EP 2408916 A2 JP 2012-520683 A WO 2010-107952 A2 WO 2010-107952 A3	2012/01/25 2012/09/10 2010/09/23 2010/11/11

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74) 代理人 100194973

弁理士 尾崎 祐朗

(72) 発明者 ホン ソンウ

大韓民国, 4 4 1 - 4 6 0, キョンギ - ド, スウォン - シ, クォンソン - グ, クムゴク - トン, ヒ
ューマンシア 5 ダンジ, 5 1 4 - 1 4 0 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA11 DA03 GA11 HA17

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA42 ZA59 ZA66 ZA81
ZA89 ZA96 ZC41